

Vergleichende Untersuchungen
zur Erythropoese
bei Ratte, Maus und Mensch

Helmut Metzger

1972

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Vergleichende Untersuchungen

=====

zur Erythropoese bei Ratte, Maus und Mensch

=====



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Fakultät für Biologie

der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Metzger

München 1972



- 1.) Referent : Prof.Dr.Dr.F.Schwarzfischer
- 2.) Referent : Prof.Dr.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer

Dekan : Prof.Dr.W.Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung : 10. Januar 1973

Mein Dank gilt Herrn Prof.Dr.Dr.F.Schwarzfischer für die freizügige Überlassung meines Themas.

Herrn Prof.Dr.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer danke ich für die Möglichkeit,diese Arbeit im Max - Planck - Institut für Biochemie,München durchzuführen.Die vielseitigen Diskussionen waren mir immer eine besondere Hilfe.

Herrn Prof.Dr. H. Ludwig danke ich für die Überlassung der Blutproben von foetalen Human-erythrocyten sowie der elektronenoptischen Aufnahmen.

Mein weiterer Dank gilt Fräulein S. Koenig für ihre fleißige technische Mitarbeit.

Diese Arbeit ist in großer Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsübersicht

=====

	Seite
Einleitung	1
Methodik	9
Ergebnisse	21
Besprechung	50
Vergleich und Wertung	68
Zusammenfassung	77
Literatur	80

Einleitung

Die Reifung und das Wachstum der Zellen gehören zu den grundlegenden Problemen in der Biologie (13,35,40,69,74, 84,85,92). Obwohl die Morphologie einer Zelle meist nur Ausdruck ihrer funktionellen Spezialisierung ist, muß man eine funktionelle und eine morphologische Differenzierung in der Zellkinese unterscheiden. Dementsprechend kann man bei den Untersuchungsmethoden auch zwei große Gruppen unterscheiden: 1. Die molekularbiologischen und biochemischen Methoden, die besonders in den letzten Jahren durch die Anwendung neuer Verfahren große Erfolge in der Erforschung der reifenden und sich differenzierenden Zelle erzielen konnten (58,61) und 2. die morphologischen Methoden, deren Ergebnisse bisher dagegen immer etwas im Hintergrund standen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist sicherlich die Tatsache, daß biochemische und biophysikalische Verfahren quantitativ meßbare Ergebnisse liefern, während sich die Befunde der morphologischen Untersuchungen auf die Beschreibung qualitativer Kriterien beschränken müssen.

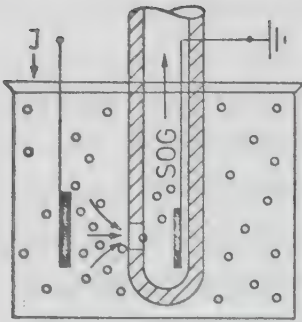
Die Zytometrie ist das einzige Meßverfahren in der Morphologie, das quantitativ Aufschluß über Wachstum, Differenzierung und Reifung einer Zelle geben kann (8,9,31,34,47,92). Grundsätzlich war aber bisher die Zytometrie nur mit Hilfe licht-optischer Methoden möglich. Durch die planimetrische Bestimmung von Zelldurchmessern bzw. -flächen wollte man dabei zu einer Aussage über das Volumen kommen, d.h., den dreidimensionalen Zustand einer Zelle. Die Problematik

dieser Messmethode spiegelt sich sowohl in der Zahlendiskrepanz der Ergebnisse als auch in der Vielzahl der Versuche wieder, dieses Verfahren so zu verbessern, daß damit vergleichbare Meßwerte gewonnen werden können (1,4,5,23,29,42, 64,86).

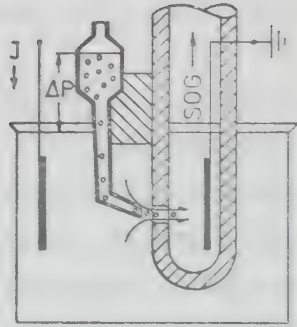
Aus der Vielfalt der möglichen Zellformen, die häufig unsymmetrisch sind, ergeben sich bereits die ersten technischen Schwierigkeiten in der Herstellung von standardisierten Präparaten, da das unterschiedliche Ausbreitungsvermögen der Zellen im Ausstrich, die Lage der Schnittebene und die fixierungsbedingten Veränderungen keine exakte planimetrische Bestimmung der Zellgröße zulassen (6,30,42). Hinzu kommen die zum Teil erheblichen individuellen Meßfehler verschiedener Personen. Wesentlich dabei ist, daß jeder Meßwert aus einer Projektionsfläche und damit seine Fehlbewertung bei der Betrachtung der dreidimensionalen Zelle entsprechend größer wird. Die Möglichkeit, daß zwei nur wenig voneinander getrennte Maxima, typisch verschiedener Zellpopulationen, zu einem gemeinsamen Maximum verschmelzen, liegt auf der Hand. In jedem Fall sind die Messungen mit einem großen Zeitaufwand verbunden und liefern in der Größe von $1-5 \times 10^2$ gemessenen Zellen relativ wenig statistisch auswertbare Ergebnisse (7,31,66). Verbunden mit den erheblichen technischen und individuellen Fehlermöglichkeiten sind also die lichtoptischen Methoden für die Zytometrie wenig geeignet, Zellen bzw. Zellpopulationen quantitativ zu charakterisieren. Im Jahre 1956 wurde das Coulter-Meßverfahren zur automatischen Zählung von Zellen entwickelt (17,18). Hierbei werden

einzelne Zellen in einem Elektrolyten, wie z. B. physiologischer Kochsalzlösung suspendiert: Bei dem Verfahren wird die Tatsache ausgenutzt, daß sich die elektrische Leitfähigkeit der Zellen von der des umgebenden Mediums stark unterscheidet (39). Tauchen zwei Elektroden, die nur durch eine Kapillaröffnung voneinander getrennt sind, in diese Suspension ein, besteht zwischen den beiden Elektroden ein elektrischer Ruhewiderstand. Immer dann, wenn ein elektrisch nicht leitendes Teilchen durch die Kapillaröffnung tritt, erhöht sich der elektrische Widerstand zwischen den beiden Elektroden (Abb. 1). Diese Widerstandsänderungen können in Spannungsimpulse umgewandelt, verstärkt und einem Analysator zugeleitet werden. Damit war die Grundlage für automatische Zellvolumenanalysen geschaffen, und es bestand die Möglichkeit, schnell und einfach bis zu 300 Messungen/sec durchzuführen (11,12,21,15,46,51,55,63,67,68).

Hinsichtlich der gesamten apparativ bedingten Problematik dieser Methode sei auf die wichtigsten Literaturangaben hingewiesen (14,36-39,53,54,70-73,77,81,83,87). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Richtigkeit dieser Zellvolumenanalysen bei der originalen Coulter-Methode zu Recht in Frage gestellt wurde, da Gauß'-verteilte Zellpopulationen wie z. B. native Erythrocyten adulter Ratten immer rechtsschiefe Volumenverteilungskurven ergaben. Die Ursache dieser Rechtsschiefe war Gegenstand unterschiedlicher Theorien. Durch vergleichende Messungen am vergrößerten Modell konnte schließlich gezeigt werden, daß die unterschiedliche elektrische Stromdichte in der Meßöffnung der handelsüblichen Coulter-



a)



b)

Abb. 1a: Original Coulter-Meßverfahren: Ein Unterdruck in der Kapillare bewirkt, daß die im Elektrolyt suspendierten Zellen durch die Meßöffnung gesaugt werden. Sie passieren aber die Meßstrecke auf unkontrollierten Bahnen.

Abb. 1b: Modifiziertes Coulter-Meßverfahren: Der Elektrolyt ist hier partikelfrei. Die Zellsuspension befindet sich in einem gesonderten Reservoir und strömt unter geringem Eigendruck ΔP durch die Zuführungsspitze auf einer definierten Bahn durch die Meßöffnung.

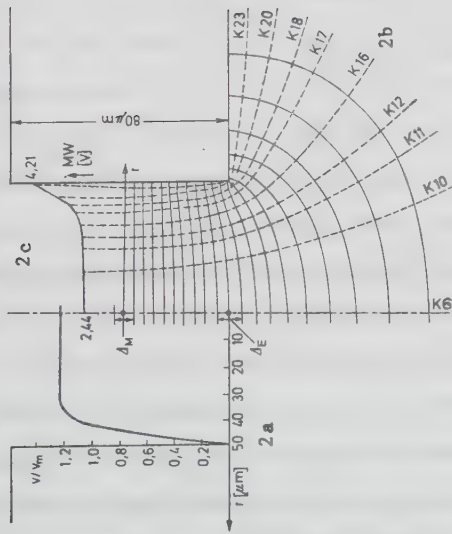


Abb. 2a: Strömungsprofil im Mesloch, etwa 80 μm vom Eingang entfernt.
 2b: Elektrische Feldverteilung vor und in der Meßöffnung mit eingezeichneten Partikelbahnen K6 - K23.
 2c: Abhängigkeit der Mittelwerte der Verteilungskurven K6 - K23 von der Partikelbahn (36).

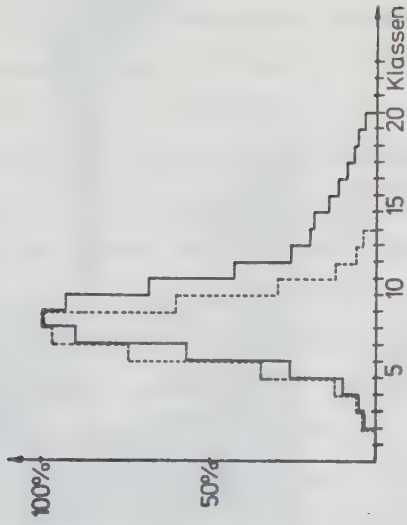


Abb. 3: Volumenverteilungskurven nativer Erythrocyten, ... im Zentralstrahl gemessen und --- nach dem Original-Coulter-Verfahren gemessen.

kapillaren eine unterschiedliche Bewertung der auf verschiedenen Bahnen durch das Meßloch tretenden Zellen bewirkt (36,37,70-73), (Abb 2). Diese Unterschiede können im Randbereich der Meßöffnung bis zu 80 % betragen und täuschen als Rechtsschiefe der Volumenverteilung eine nicht vorhandene Zellpopulation vor (Abb. 3). Es wurden deshalb neue Partikelstrahlkapillaren entwickelt, bei denen die Zellen auf definierten Bahnen durch das Meßloch treten. (36,37,71-73), (Abb. 1b, Abb.4). Die Genauigkeit des Meßverfahrens, insbesondere aber die Aussagekraft über die Verteilungsart einzelner Zellpopulationen, konnte damit entscheidend verbessert werden, und es war erstmals möglich, auch mehrgipflige Volumenverteilungskurven von sich überlappenden Zellpopulationen zu analysieren. (55,78,79).

Die Hämatologie und in besonderem Maße die Zellen der roten Blutreihe bieten sich dieser Methode zur Messung der Zellvolumina an. Die Zellen lassen sich nämlich, ohne daß weitere Präparationsschritte notwendig werden, in meist ausreichender Zahl als Einzelzellen aus der Blutbahn gewinnen. In einem geeigneten Medium suspendiert, bleiben sie auch längere Zeit funktionstüchtig und zeigen keine morphologischen Veränderungen. Die Erythropoese stellt als Beispiel der morphologischen und funktionellen Differenzierung von Zellen ein Prinzip dar, das für die gesamte Biologie große Bedeutung erlangt hat. Die Erythropoesemechanismen der Säugetiere zeigen nicht nur charakteristische Besonderheiten bei den verschiedenen Spezies (5,23,88-91), sondern auch innerhalb einzelner Spezies unterscheidet sich die Erythropoese des Foeten, Neugeborenen



a)



b)

Abb. 4a und b: Durch Farbstoff markierte Partikelkanäle (36).

a) Durchtrittsbahn im Kernbereich des Meßloches

b) Durchtrittsbahn am Rande des Meßloches.

und Erwachsenen morphologisch und biochemisch deutlich voneinander (3,5,22,29,40,41,44,47,58,59,83,86). Die roten Blutzellen werden in zeitlich festgelegter Reihenfolge in verschiedenen Organen gebildet und reifen dann unter Verlust ihres Kernes über mehrere Zwischenformen zu bikonkaven Erythrocyten (10,16,20,49,50,68,75,80).

In der Literatur über die Reifung der Säugetiererythrocyten gibt es einige Hinweise aus Befunden der Morphologie und Zytometrie, die zur Zeit der embryonalen und postnatalen

Blutbildung verschiedene Erythrocytenpopulationen vermuten lassen (2,4,11,15,19,32,46,62,78,79,93).

Die vorliegende Arbeit zeigt mit Hilfe des elektronischen Partikelstrahlverfahrens solche Zellpopulationen der Erythropoese bei Foeten, Neugeborenen und Erwachsenen in verschiedenen Lebensaltern. Die einzelnen Populationen werden durch das mittlere Zellvolumen, den Variationskoeffizienten sowie den prozentualen Anteil an der Gesamtverteilung charakterisiert und mögliche Zusammenhänge zwischen Bildungsort einerseits, und dem Zeitpunkt des Auftretens neuer Zellpopulationen andererseits, geprüft. Diese neuen zytometrischen Ergebnisse in Verbindung mit den bereits bekannten morphologischen Befunden der blutbildenden Organe während der Reifung des erythropoetischen Systems stellen die Frage: Wird die Erythropoese der Säuger nur durch eine oder aber durch mehrere genetische Codefolgen geregelt? Ein Vergleich der erythropoetischen Systeme bei Ratte, Maus und Mensch stellt Besonderheiten, Übereinstimmungen und mögliche Zusammenhänge dar und versucht eine Antwort auf die Frage zu finden, welcher genetische Mechanismus die Erythropoese der Säuger regelt.

Methodik

Versuchsmaterial

Als Ausgangstiere wurden Mäuse vom Stamm Balb CJ₂ (Jackson Laboratory, Bar Harbor/Maine, USA) und Sprague-Dawley Koloniezuchtratten (Firma Gassner, München-Ottobrunn, Deutschland) verwendet, die zum Erhalt von Foeten und Neugeborenen selbst weitergezüchtet wurden. Die Tiere wurden mit Altromin R-Standarddiät und Wasser ad libidum ernährt. Je Versuch waren 2-4 Versuchstiere angesetzt.

Die Blutproben von menschlichen Foeten und Neugeborenen, sowie von 10-12 Tage alten Säuglingen wurden von der 1. Universitäts-Frauenklinik, München zur Verfügung gestellt. Bis zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren sämtliche Kinder unbehandelt.

Gewinnung der roten Blutzellen

Intrauterine Periode: Bei Maus und Ratte wurde die Bauchhöhle der Muttertiere unter Äthernarkose eröffnet, die Uterusmuskulatur längs durchgetrennt, dann die Foeten samt Fruchtblase und Plazenta herausgeschält und um möglichst alles mütterliches Blut auszuspülen, in physiologischer Kochsalzlösung (siehe Suspensionsmedien) gewaschen. Dann wurde der Embryo aus den Eihüllen herauspräpariert und der Nabelstrang durch eine Ligatur unterbunden. Um Verunreinigungen durch das Fruchtwasser zu vermeiden, wurde der Foet nochmals vorsichtig mit Kochsalzlösung abgespült. Nach Durchtrennung des Nabelstranges wurde der Foet in 5-10 ml der zur Zellvolumenmessung vorbereiteten Suspensionslösung gelegt und solange darin belassen, bis kein Blut mehr aus den Gefäßen des Nabelstranges austrat. Foeten des 9.-11. Schwangerschaftstages wurden zu-

sätzlich in Höhe des Herzens durchgetrennt. Aus einer Schwangerschaft wurden die Blutproben von mindestens 2-3 Foeten gemessen.

Der Gewinnung von nativem Blut menschlicher Foeten waren durch die Indikation zur Schwangerschaftsunterbrechung enge Grenzen gesetzt. Bestand eine Indikation, setzten die medizinisch-physiologischen Prinzipien einer für die Mutter möglichst schonenden Operationstechnik noch engere Grenzen. Aus diesem Grunde konnte natives Foetalblut nur zwischen der 12. - 16. Schwangerschaftswoche gewonnen werden, wenn der Eingriff als abdominelle Hysterotomie durchgeführt wurde: Nach Eröffnung des Uterus wurde die Fruchtblase aus dem Nidationsbett herausgeschält, wobei der Trophoplast mit den Eihäuten intakt blieb. Die Fruchtblase wurde inzidiert und der Embryo aus dem Eisack herausgehoben. Zur Gewinnung des foetalen Blutes wurde dann die Nabelschnur oder das Herz punktiert, wobei die Spritze vorher mit Vetren (100 I.E. Heparin/ml Blut, Promota, Hamburg) gespült wurde.

Extrauterine Periode: Die Blutproben der postnatalen Phase wurden bei Maus und Ratte in Äthernarkose durch Punktion des Herzens gewonnen. Die Zellen wurden direkt in der für die Messung vorbereiteten Lösung suspendiert.

Aus Transportgründen wurden beim Menschen die Blutproben in heparinisierten Mikro-Hämatokritröhrchen (Clay-Adams, New York, USA) gesammelt und zwar bei Neugeborenen nach der Abnabelung aus dem Nabelstumpf des Kindes, beim 10-12 Tage alten Säugling aus der Ferse und bei den etwa 40-jährigen Versuchspersonen aus dem Ohr läppchen.

Sämtliche Blutproben von Tier und Mensch wurden innerhalb von maximal 30 Minuten für die Messung verwendet.

Suspensionsmedien

Die neu entwickelte Partikelstrahlkapillare bietet gegenüber der handelsüblichen Coulterkapillare u.a. auch den Vorteil, daß z.B. Erythrozyten im eigenen Plasma, ihrem natürlichen Umgebungsmilieu, gemessen werden können. Für die Messung braucht man etwa 1,5 ml Plasma, wofür etwa 4,0 ml Vollblut benötigt werden. Diese Mengen stehen aber bei der Maus und Ratte in den besonders interessanten ersten 30 Tagen nach der Geburt nicht zur Verfügung und auch menschlichen Neugeborenen können diese Mengen nur in Ausnahmefällen entnommen werden.

Es wurde deshalb für die gesamten Messungen eine gepufferte Kochsalzlösung folgender Zusammensetzung verwendet:

0,35 M NaCl; 0,0043 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$; 0,023 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,005 M $\text{mgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua bidest. (pH 7,35; $300 \pm 5 \text{ mOsm/l}$). Durch vergleichende Messungen mit Blutproben von Maus, Ratte und Mensch konnte gezeigt werden, daß die verwendete Kochsalzlösung innerhalb von 30 Minuten weder die Form der Verteilungskurve, noch das mittlere Zellvolumen im Vergleich zu Messungen der Zellen im Eigenplasma verändert. Die Suspensionslösung wurde jeweils vor Verwendung durch ein Membranfilter, Porengröße 0,1 μm (Satorius, Göttingen) gefiltert, im Vakuum entgast und durch einen Thermostaten auf eine Temperatur von 25°C eingestellt.

Volumenverteilungskurven

Die Volumenverteilungskurven wurden nach dem in der Einlei-

tung beschriebenen Coulterprinzip unter Verwendung einer Partikelstrahlkapillare aufgenommen. Die Messöffnung hatte einen Durchmesser von $70\text{ }\mu\text{m}$ und war $36\text{ }\mu\text{m}$ lang. Bei einem Meßstrom von $0,2\text{ mA}$, einer Temperatur von 25°C und einem Sog von $0,08\text{ kp/cm}^2$ wurden bei einer maximalen Zählgeschwindigkeit von 300 Partikeln/sec je Volumenverteilungskurve 2×10^4 Zellen gemessen. Die Impulse wurden einem Klassiergerät IFK (Max-Planck-Institut f. Biochemie, Martinsried bei München) in Verbindung mit einem UC-Impulshöhenanalysator (Rhode und Schwarz, München) zugeleitet. Die Zahlenwerte der Häufigkeitsverteilungen wurden graphisch dargestellt, digital ausgedruckt und als Lochstreifen gestanzt. Der maximale Messbereich lag zwischen $0,15$ und $9,60\text{ Volt}$ und umfaßte 64 Klassen.

Kurvenanalyse (77,78)

Zunächst wurden die Volumenverteilungskurven um den im Anfangsteil exponentiell abfallenden Hintergrund korrigiert (Abb. 5a-c): Die Partikelzahl jeder Klasse wurde in ein einfaches Logarithmenpapier eingetragen und aus der nach unten verlängerten Geraden die Werte abgelesen, die von der entsprechenden Klasse als Hintergrund subtrahiert werden mußten. Die so korrigierte Restverteilung wurde dann in ein lineares Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen, die sichtbaren Gipfel der Verteilung markiert und dann geprüft, wieviele Bereiche dieser Gesamtverteilung einer Geraden entsprachen. Damit war es möglich, in etwa die Zahl der Einzelpopulationen in der Gesamtverteilung zu bestimmen. Zur weiteren Kurvenanalyse wurde im Wahrscheinlichkeitsnetz geprüft, welcher Teil der Gesamtkurve am wenigsten von einer anderen Zellpopulation überlagert war. Diese Flanke wurde dann an ihrer Symmetrieachse

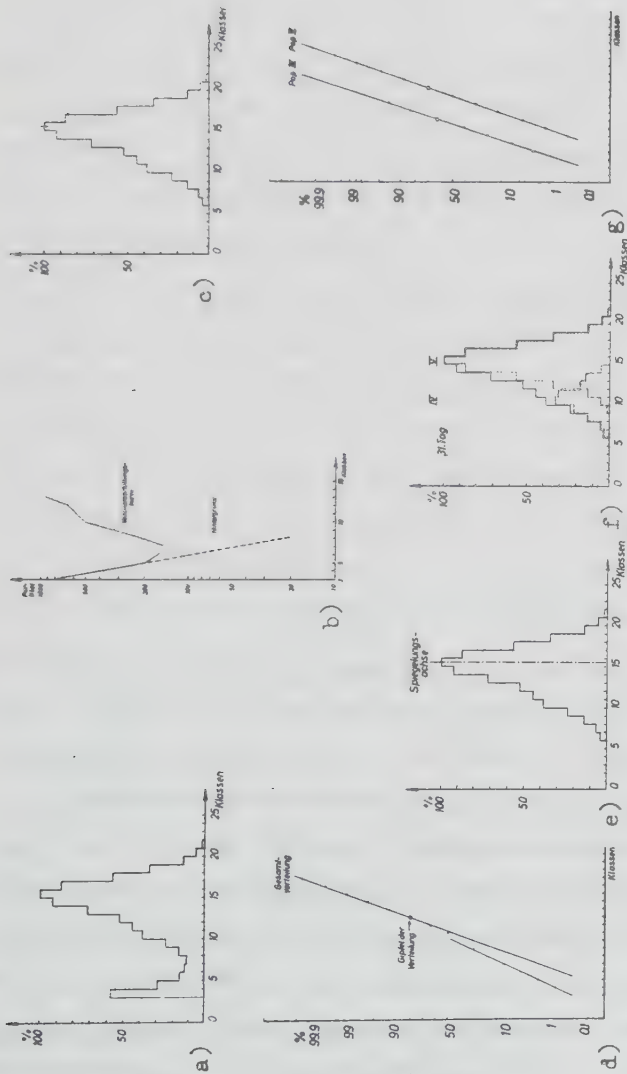


Abb. 5a-c: Korrektur der Volumenverteilungskurve um den exponentiell abfallenden Hintergrund (78).

Abb. 5d-g: Analyse der Volumenverteilungskurve zur Darstellung von Einzelpopulationen (78).

nach links oder rechts gespiegelt und die Restverteilung errechnet. Beide so erhaltenen Populationen wurden wiederum in das lineare Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen und auf Gauß' Verteilung geprüft (Abb. 5d-g). Ergaben sich aus der Restverteilung Anhaltspunkte für weitere Normalverteilungen, wurde die Kurvenanalyse in gleicher Weise fortgesetzt. Von den Einzelpopulationen wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet, und der Variationskoeffizient als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert bestimmt. Außerdem wurde das mittlere Volumen aus der Gesamtverteilung berechnet, um auch Vergleiche mit den früher in der Literatur angegebenen Meßwerten anstellen zu können. Die Zahlenangaben der Tabellen sind Mittelwerte von Zellen von mindestens 4 Versuchstieren gleichen Alters, die an 2-3 verschiedenen Tagen gemessen wurden. Die graphischen Darstellungen sollen im Wesentlichen die typischen Veränderungen der Gesamtverteilung und die Kinetik der Einzelpopulationen verdeutlichen.

Eichung des Gerätes zur Bestimmung absoluter Zellvolumina (54)

Für die Eichung elektronischer Meßgeräte, die auf dem Coulterprinzip basieren, lassen sich grundsätzlich zwei Methoden zur Bestimmung absoluter Zellvolumina unterscheiden:

1. Die Partikeleichung (12, 17, 18, 24, 25, 38, 43, 48, 51, 52, 56, 65)
- und 2. die elektronische Eichung (26-28, 38, 54). Die Partikeleichung bietet theoretisch den Vorteil, daß sämtliche Fehlermöglichkeiten des Systems ausgeschlossen werden können, wenn von den Eichpartikeln die folgenden Voraussetzungen streng erfüllt werden: a) Volumenschwankungen der Partikel in Abhängigkeit von Aufbewahrungsart und -dauer sowie vom Suspensionsmedium, in dem sie gemessen werden, müssen ausgeschlos-

sen sein und b) um für eine Eichung vergleichbare Verhältnisse beim Durchtritt durch die Messöffnung zu schaffen, müssen die verwendeten Partikel den zu messenden Zellen in Größe, Form und Elastizität genau entsprechen. Derzeitig stehen als Eichpartikel nur native und glutaraldehydfixierte Erythrocyten verschiedener Spezies, Pollen und Polystyrenpartikel zur Verfügung. Sie können die oben genannten Voraussetzungen aber meist nur teilweise erfüllen, so daß die Angaben absoluter Zellvolumina fragwürdig sind.

Die andere Möglichkeit besteht in der elektrischen Eichung des Gerätes und der Berechnung der absoluten Zellvolumenmittelwerte nach bekannten Formeln (26-28,33,54). Folgende apparativ bedingte Voraussetzungen müssen dabei berücksichtigt werden: 1. Die Bandbreite des Verstärkers, 2. die

Besonderheiten des elektrischen Feldes in der Meßöffnung und 3. die möglichen Formveränderungen der Zelle beim Durchlaufen der Meßstrecke. Diese Fehlermöglichkeiten, die das Meßverfahren beeinflussen können, werden erstmals in der Formel

$$V = 10 \cdot \frac{R^4 \cdot \bar{x} \cdot K}{g \cdot D \cdot F} \quad (54) \text{ berücksichtigt. Dabei bedeutet:}$$

V Zellvolumen in μm^3

R Radius der Meßöffnung in μm . Verwendet wurde eine Kapillare, deren Meßloch laut Herstellerfirma (Coulter Electronics LTD, Dunstable, Bedfordshire, England), einen Durchmesser von 70 μm hatte. Diese Angabe wurde mit einem Zeiss UMM-Meßmikroskop nachgeprüft und wurde innerhalb $\pm 0,5 \mu\text{m}$ bestätigt.

$\bar{x}$ Impulshöhe in Volt: Entweder als Mittelwert nur einer, für die Verteilung aber typischen Klasse, oder als Mittelwert aller Impulse einer Gesamtpopulation.

K Kapillarfaktor (37): Bei der verwendeten Kapillare mit einem

Meßloch von $70\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser und nur $36\text{ }\mu\text{m}$ Länge ist das elektrische Feld auch im Kernbereich des Meßloches nicht homogen und bewirkt eine Unterbewertung des Zellvolumens um Faktor 1,33 (54). Dieser sogenannte Kapillarfaktor berücksichtigt also diese für jede Meßöffnung typische Besonderheit des elektrischen Feldes, die in Abhängigkeit vom Verhältnis des Lochdurchmessers zur Lochlänge steht (37).

g Spezifischer Widerstand des Suspensionsmediums in $\text{Ohm} \times \text{cm}$: Er wurde vor und nach jeder Messung mit einer Leitfähigkeitsmeßzelle PR 9513, Zellkonstante 0,67 (Philips Industrie Elektronik, Hamburg) in Verbindung mit einer Widerstandsmeßbrücke GM 4249 / 01 bestimmt (Philips Industrie Elektronik, Hamburg). Da der spezifische Widerstand einer Lösung temperaturabhängig ist, war die Kochsalzlösung immer auf 25°C thermostatisiert.

D Eichfaktor in Ohm/Volt : Ein Generator simuliert die Impulse (28), die beim Partikeldurchtritt durch das Meßloch entstehen. Der Ruhewiderstand der Meßöffnung wurde durch einen in Serie zum Impulsgenerator geschalteten, entsprechenden ohmschen Widerstand zusätzlich berücksichtigt. Dem Eichfaktor D, der bei gleicher Verstärkung und Stromstärke wie das Meßgut gemessen wurde, entsprach dann die Impulshöhe, die bei 1 Ohm Widerstandsänderung gemessen wurde.

F Formfaktor (26,27,33,37): Treten Partikel kugelförmig durch ein elektrisches Feld, so wird ihr Volumen um den Faktor 1,50 überbewertet. Dagegen werden ellipsoidförmige Partikel in Abhängigkeit von ihren Achsenverhältnissen weniger überbewertet, wenn ihre längsten Achsen parallel zum elektrischen Feld ausgerichtet sind. Diese Überbewertung kann als

sogenannter Formfaktor nach bekannten Formeln berechnet werden, wenn der Quotient: $r = \frac{\text{kleiner Durchmesser}}{\text{großer Durchmesser}}$ bekannt ist. Die im Meßloch einer Kapillare auftretenden Strömungskräfte können die hindurchtretenden Zellen in Abhängigkeit von deren Elastizität verformen. So sind verschiedenen Zellarten, entsprechend ihrer Form beim Durchlaufen der Meßstrecke, auch unterschiedliche Formfaktoren zuzuordnen: In einer horizontal angeordneten Strahlenkammer ist es möglich, die Zellen während der Passage durch die Meßöffnung zu fotografieren, so daß das Achsenverhältnis und damit auch der Formfaktor bestimmt werden können (36,37).

In den ersten Tagen der foetalen Blutbildung überwiegen die kernhaltigen Zellen, die eine unterschiedliche Deformierung in der Meßöffnung zeigen (Abb. 6,7). Da bei der Ratte und bei der Maus eine Zuordnung charakteristischer Formveränderung und damit verschiedene Formfaktoren zu einer bestimmten kernhaltigen Zellpopulation nicht möglich war, wurde der Formfaktor als Mittelwert $F_m = 1,24 \pm 0,07$ aus 30 Messungen errechnet. Unterschiede zwischen Maus und Ratte waren nicht festzustellen.

Kernlose Erythrocyten von Ratte, Maus und Mensch zeigen eine wesentlich größere und gleichmäßigere Verformung beim Durchlaufen der Meßstrecke. Sie verformen sich alle mehr oder weniger zigarrenförmig und haben dadurch einen kleineren Formfaktor. Für die pränatale Periode vom 13.-20. Schwangerschaftstag wurde der Formfaktor ebenfalls als Mittelwert aus 20 Messungen errechnet und ergab $F_m = 1,04 \pm 0,03$. Nach Geburt war der Formfaktor mit einem Fehler kleiner 2 % für native Erythrocyten 1,0.

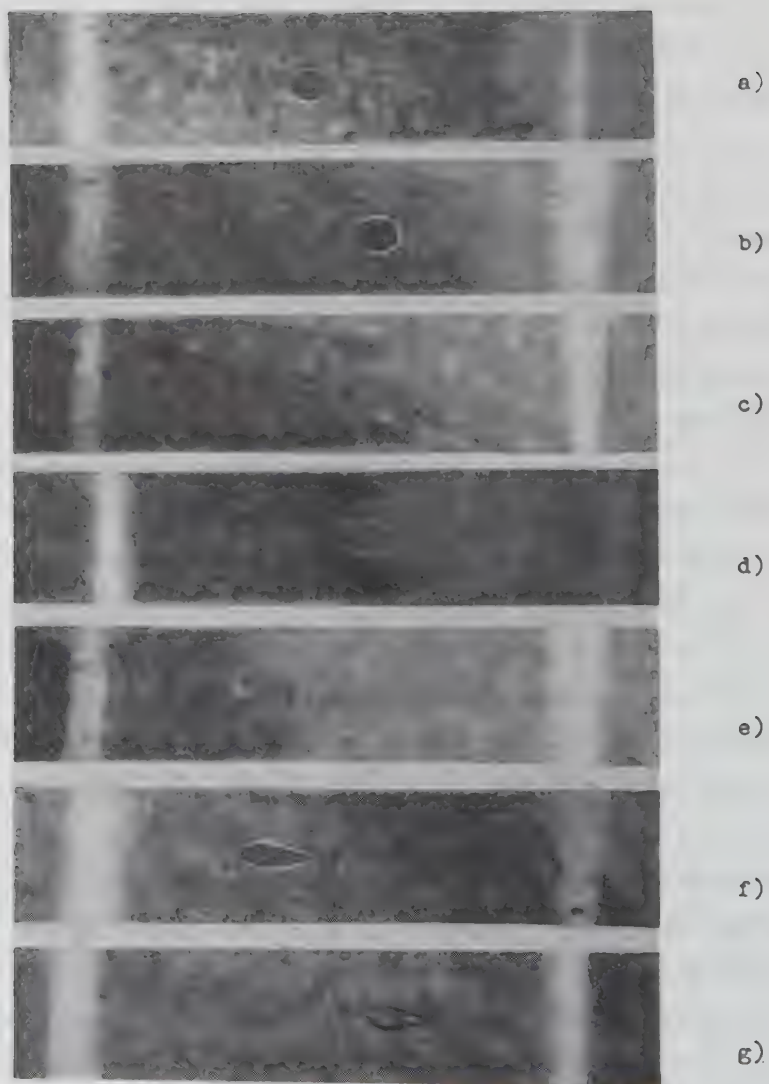


Abb.6a-g:Die Verformung kernhaltiger roter Blutzellen vom
11.Schwangerschaftstag beim Durchlaufen der Meß-
strecke (Maus).

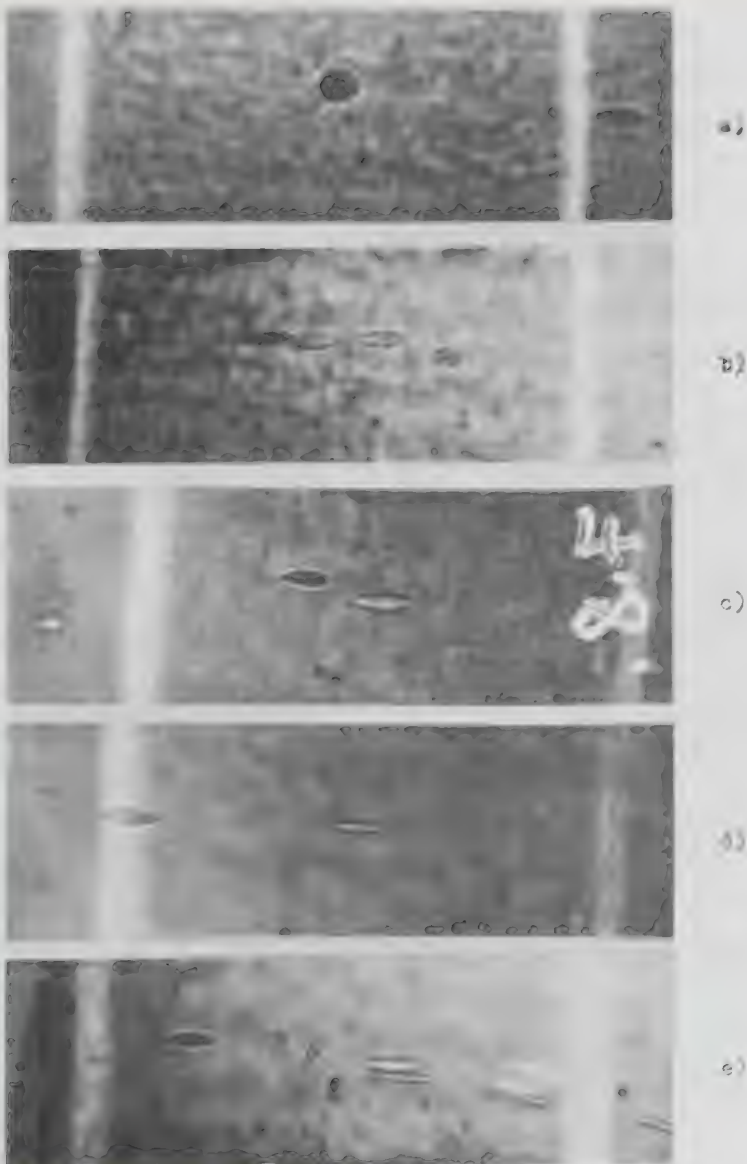


Abb.7 Die Verformung kernloser roter Blutzellen beim Durchlaufen der Meßstrecke

a-c 14.-17.Schwangerschaftstaz bei der Ratte; die hohelförmigen Zellen in a) und b) sind kernhaltige Zellen.

d-e 18.-20.Schwangerschaftstaz bei der Maus.

Diese Parameter R, K und F, die bei einer elektrischen Eichung und einer Berechnung von absoluten Zellvolumina zu beachten sind, müssen nur einmal bestimmt werden und stellen dann Konstanten dar. Die Bestimmung von $\mathcal{S}$ und D ist einfach und schnell durchzuführen, und bietet zudem die Möglichkeit einer laufenden Eichkontrolle zwischen den einzelnen Messungen (54). Liegen die Häufigkeitsverteilungen der Zellpopulationen außerdem in Form von Lochstreifen vor, können die gesamten Berechnungen der mittleren Zellvolumina, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten mit Hilfe eines Computer automatisch durchgeführt werden.

Ergebnisse

Ratte: Die am 9. Schwangerschaftstag im peripheren Blut nachzuweisenden Blutkörperchen sind kernhaltige Zellen, deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Zellen im Laufe der folgenden Schwangerschaftstage kleiner wird. Ab dem 16. Schwangerschaftstag sind sie nicht mehr in der Blutbahn nachzuweisen. In May-Grünwald/Giemsa gefärbten Ausstrichen lassen sich zwischen 9. und 15. Schwangerschaftstag verschiedene kernhaltige Zellformen nachweisen: Zellen mit großen, blass-basophil gefärbten, großvakuoligen Kernen und zwei weitere Zellformen mit zwar kleineren, dichten, stärker basophil gefärbten, kleinvakuoligen Kernen aber deutlich verschiedener Kern-Plasmarelation. Vereinzelt lassen sich auch zweikernige Zellformen darstellen (Abb. 8). Nach dem 12. Schwangerschaftstag sind neben diesen kernhaltigen auch kernlose Zellen in der Blutbahn nachzuweisen (Abb. 9). Zunächst sind sie kugelförmig, in der Folge napf- bis glockenförmig. Neben der ausgeprägten Anisocytose und Poikilocytose (Abb. 10) weisen die Zellen dieser kernlosen Zellpopulation auch eine unterschiedliche Anfärbbarkeit auf. Ein Teil der Zellen färbt sich blaß rosa-acidophil, ein anderer blaugrau, schwach basophil. Zum Zeitpunkt der Geburt sind nur noch schwach acidophil gefärbte Zellen zu sehen. Anisocytose und Poikilocytose bilden sich bis zum 84. Tag nach Geburt langsam zurück. Dann sind sämtliche Zellen der roten Reihe, entsprechen dem Blutbild einer adulten Ratte, bikonkav und weisen weitgehend einheitliche Größen auf.

Die Volumenverteilungskurven zeigen an verschiedenen Zeit-

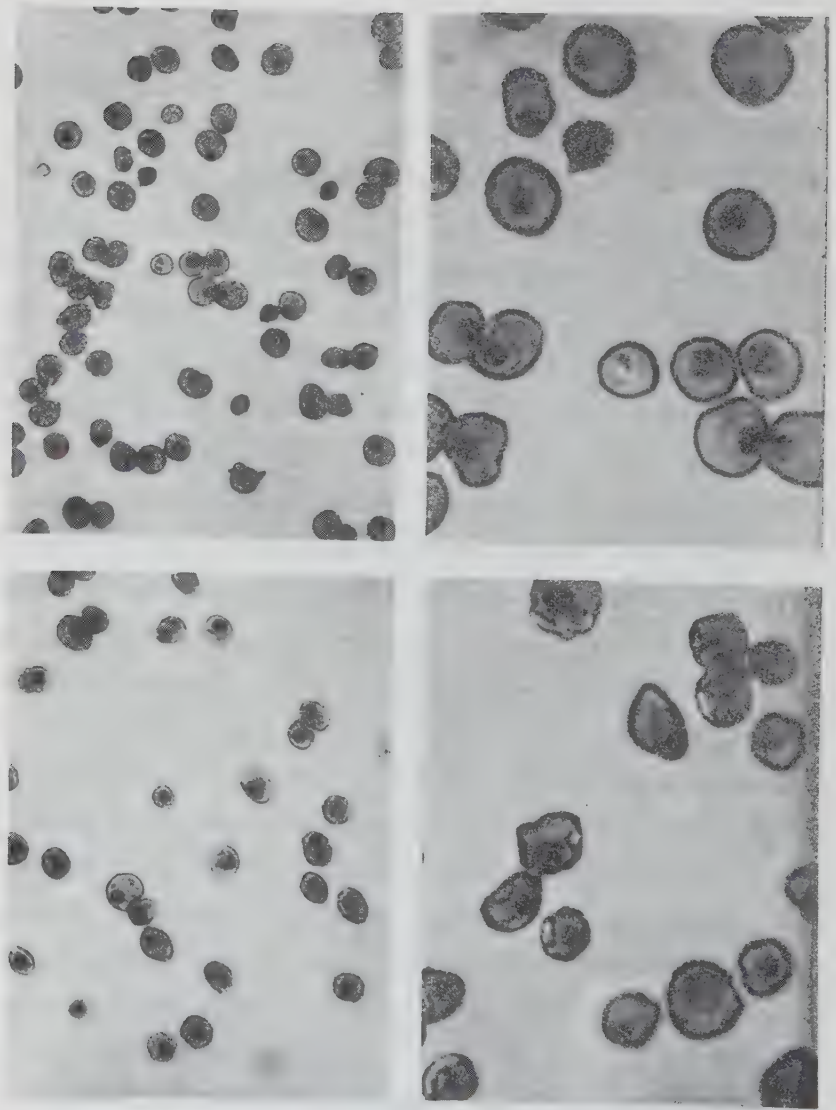


Abb.8: Morphologie der roten Blutzellen zwischen dem 9. und 12.Schwangerschaftstag bei der Ratte.Vergrößerung linke Bildreihe 800-fach,rechte Bildreihe 1900-fach.

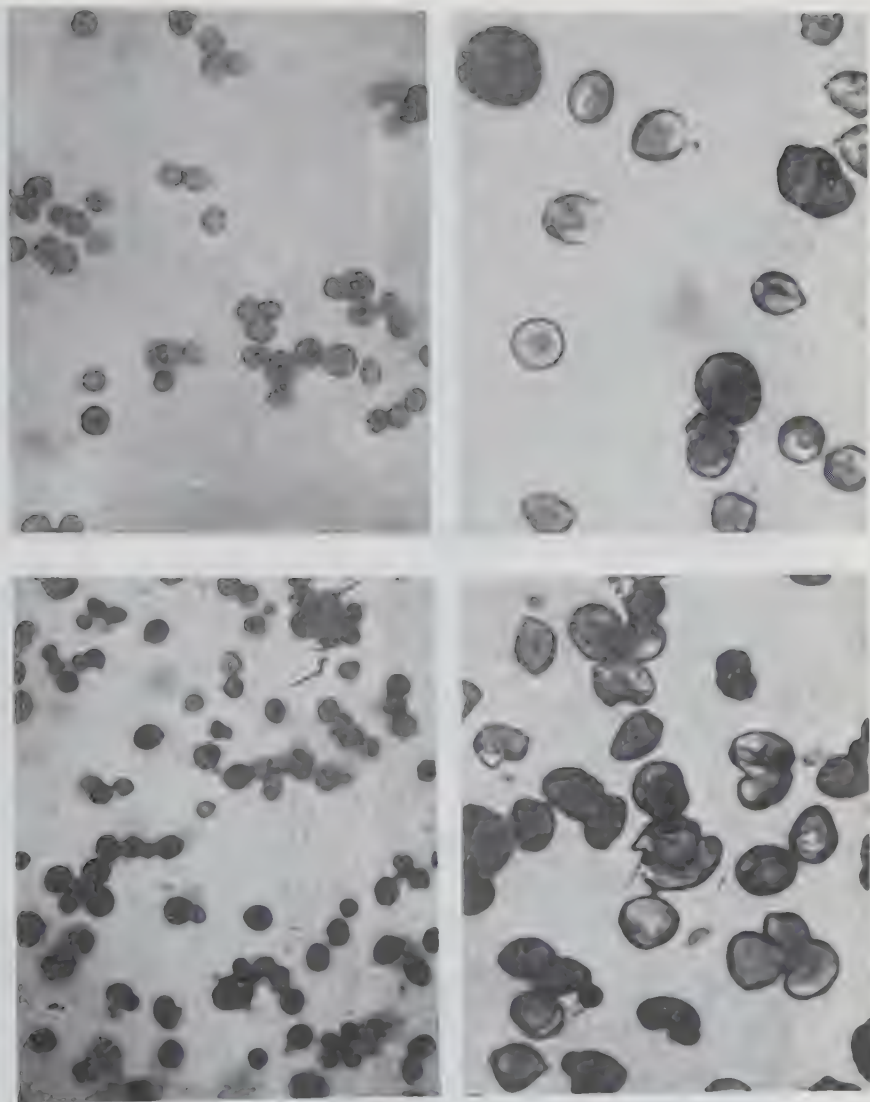


Abb.9: Morphologie der roten Blutzellen zwischen dem 13. und 16.Schwangerschaftstag bei der Ratte.Vergrößerung links 800-fach,rechts 1900-fach.

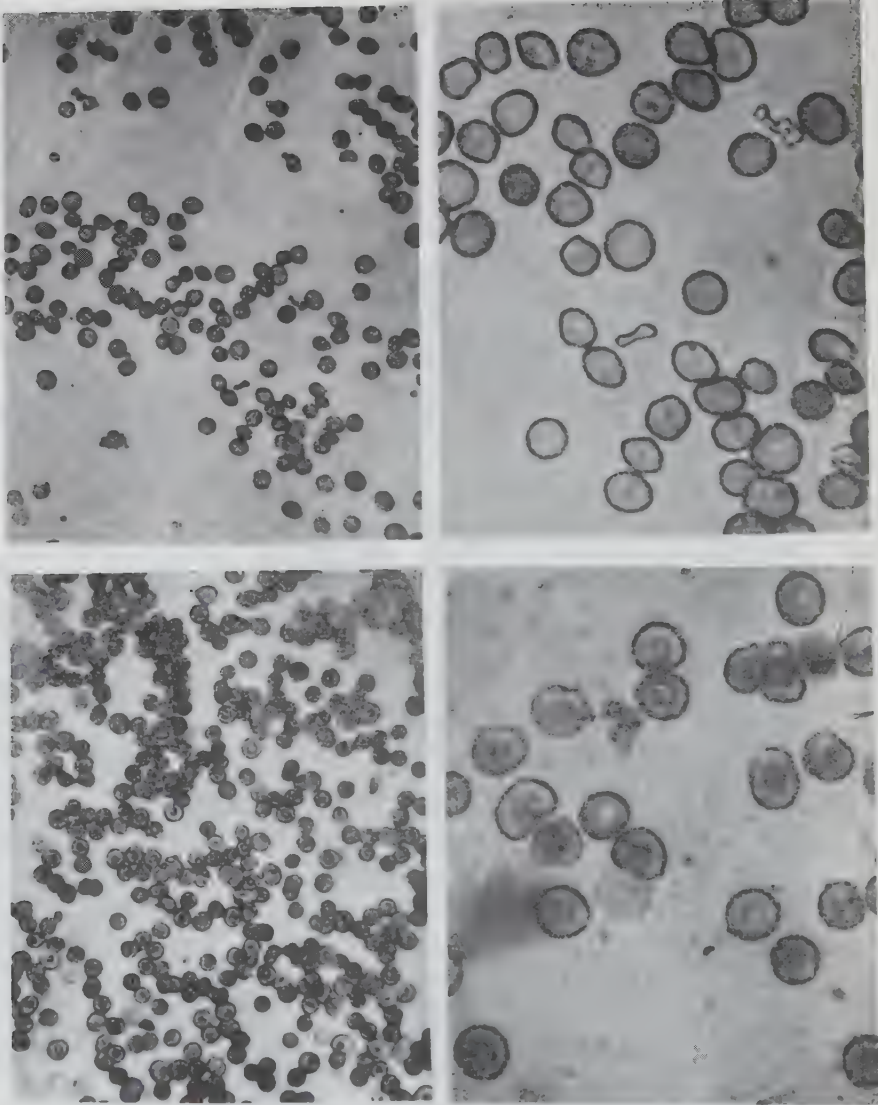


Abb.10: Morphologie der roten Blutzellen zwischen dem 17. und 20.Schwangerschaftstag bei der Ratte.Vergrößerung links 800-fach,rechts 1900-fach.

punkten vor und nach Geburt ebenfalls typische Veränderungen. Insgesamt lassen sich durch Analyse der Verteilungskurven 8 Populationen während der Erythropoese nachweisen: Zwischen dem 9. und 16. Schwangerschaftstag 3 kernhaltige Zellpopulationen (Abb. 12a-e) und vom 13. Schwangerschaftstag bis zum Erwachsenenalter 5 kernlose Zellpopulationen (Abb. 13a-d, 14 a-q). Die einzelnen Populationen nehmen im Laufe der Entwicklung in charakteristischer Weise zu und ab (Tab. 1). Sie sind aber zu jedem Zeitpunkt, bei Prüfung im linearen Wahrscheinlichkeitsnetz, mit guter Näherung normal verteilte Zellpopulationen (Abb. 14a-h).

Die Kurvenanalyse der Volumenverteilungen vom 9. Schwangerschaftstag ergibt 3 Zellpopulationen (Abb. 12a). Sie entsprechen den zu diesem Zeitpunkt in der Blutbahn vorkommenden kernhaltigen Zellen und weisen mittlere Zellvolumina von $499,8 \mu\text{m}^3$ für Population I, $628,3 \mu\text{m}^3$ für Population II und $763,0 \mu\text{m}^3$ für Population III auf. Dabei hat Population I mit 53,4 % den größten prozentualen Anteil, während Population II mit 20,0 % und Population III mit 26,6 % kleinere, etwa gleiche Anteile an der Gesamtpopulation haben (Tab. 1,2). In der Folge ist Population I bis zum 11., Population III bis zum 13. und Population II nur bis zum 15. Schwangerschaftstag in der peripheren Blutbahn nachzuweisen (Abb. 12b-e). Das mittlere Zellvolumen der einzelnen Populationen nimmt bis zu ihrem Verschwinden aus der Blutbahn jeweils um etwa 10 % ab (Tab. 2).

Am 13. Schwangerschaftstag läßt sich eine neue Population nachweisen, die den zu diesem Zeitpunkt in die Blutbahn aus-

geschwemmten kernlosen Zellen entspricht (Abb. 12c). Dabei deutet die Rechtsschiefe der Verteilung bereits auf mehrere Zellpopulationen hin. Bei größerer apparativer Auflösung ergibt die Kurvenanalyse zwei Zellpopulationen mit zunächst gleichen prozentualen Anteilen bis zur Geburt (Abb. 13a-d). Nach der Geburt läßt sich eine weitere Population in der Blutbahn nachweisen, deren prozentualer Anteil an der Gesamtverteilung in den folgenden Tagen zunimmt, während die Anteile von Population I und II kleiner werden und ab dem 15. bzw. 20. Tag post partum im peripheren Blut nicht mehr nachzuweisen sind. Am 27. Tag nach Geburt ist auch Population III wieder aus dem Kreislauf verschwunden. Sich damit überlappend, werden aber ab dem 20. bzw. 27. Tag zwei weitere Populationen in die Blutbahn ausgeschwemmt. Dabei stellt Population V nach dem Verschwinden der Population IV am 84. Tag die Endpopulation dar (Abb. 11a, b; 14a-q).

Zum Zeitpunkt ihres Auftretens in der Blutbahn liegen die mittleren Volumina der kernlosen Zellen für Population I mit $195,9 \mu\text{m}^3$, für Population II mit $242,9 \mu\text{m}^3$ und für Population III mit $181,2 \mu\text{m}^3$ auffallend gleich bei etwa $200 \mu\text{m}^3$, während die mittleren Zellvolumina für Population IV und V mit $86,5 \mu\text{m}^3$ bzw. $101,3 \mu\text{m}^3$ anfangs nur bei etwa $100 \mu\text{m}^3$ liegen. Im Laufe der prae- und postnatalen Entwicklung nehmen die mittleren Zellvolumina sämtlicher Populationen ab. Auffallend ist hier, daß Population I und II unter einem Volumenverlust von etwa 80 % jeweils bei einem Endvolumen von $36,2 \mu\text{m}^3$ aus der Blutbahn verschwinden, während Population III nur 37 %, Population IV 51 % und Population V nur 38 % ihres

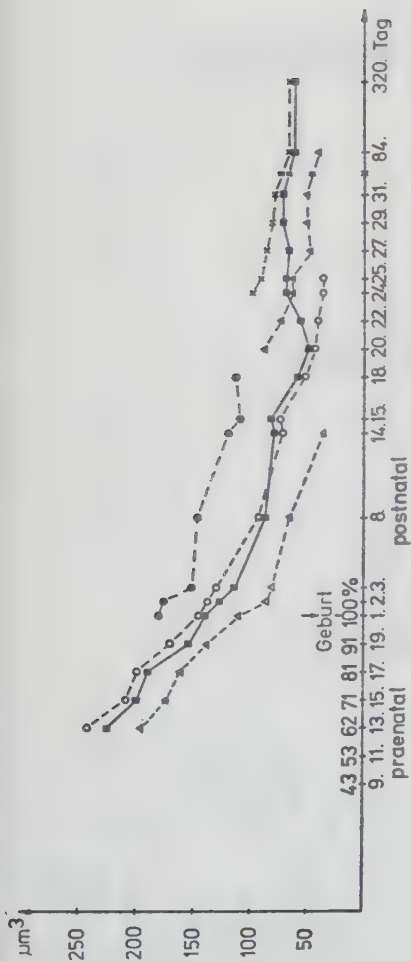


Abb. 11a

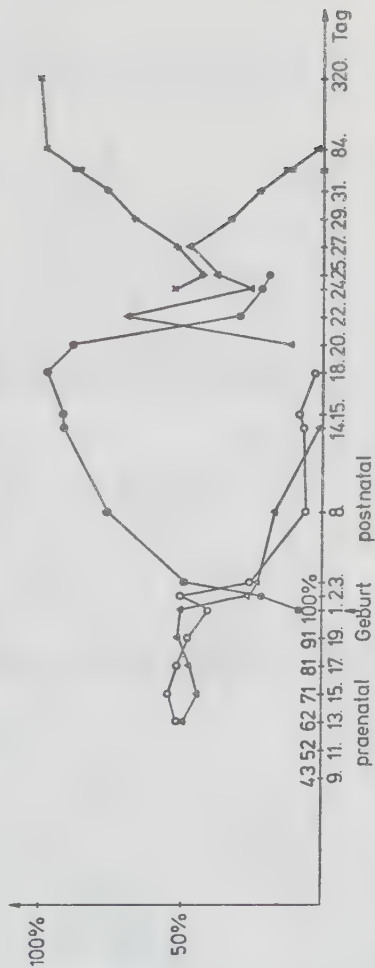


Abb. 11b

Abb. 11a: Die mittleren Zellvolumina der kernlosen Einzelpopulationen zu verschiedenen Zeitpunkten bei der Ratte.

Abb. 11b: Die prozentualen Anteile dieser Populationen, jeweils zu gleichen Zeit.

Abzisse: die Schwangerschaftstage sind auch in % der Tragzeit (21 Tage=100%) angegeben.
 ... Population I; ... Population II; ... Population III; ... Population IV; ... Population V.

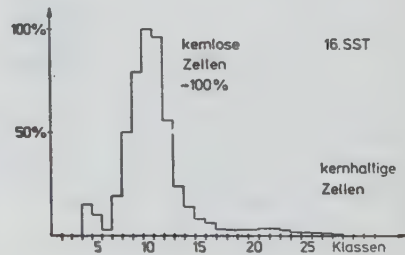
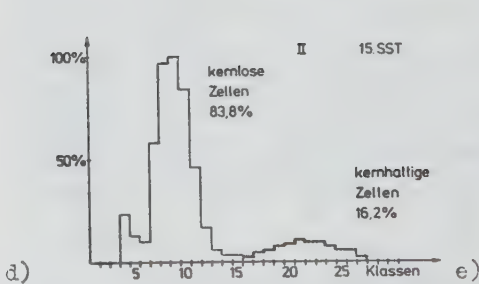
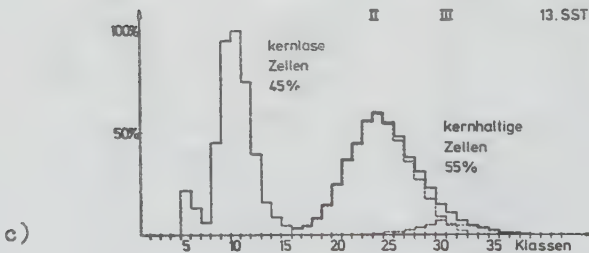
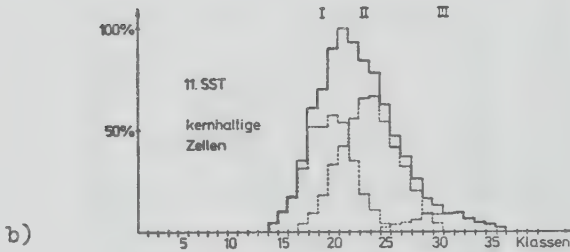
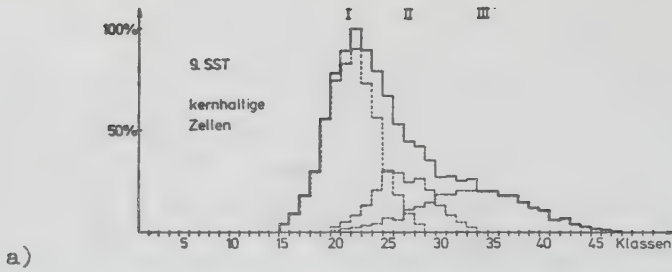


Abb. 12a-e: Analysierte Volumenverteilungskurven kernhaltiger Zellpopulationen zwischen dem 9. und 16. Schwangerschaftstag bei der Ratte. Ordinate: häufigster Wert entspricht 100%; Abszisse: Klassenbreite $22,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^3$.

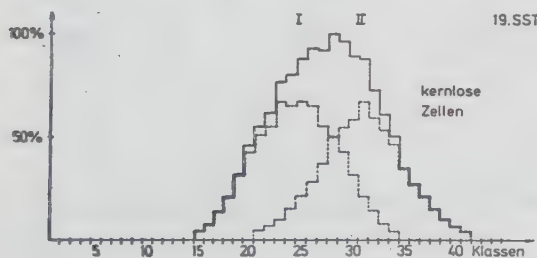
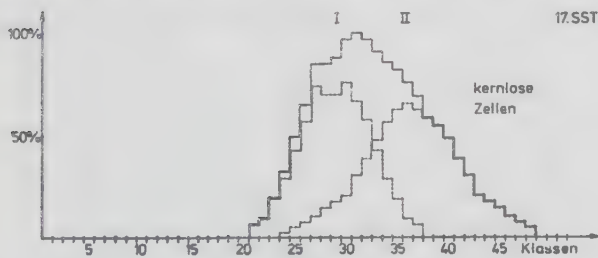
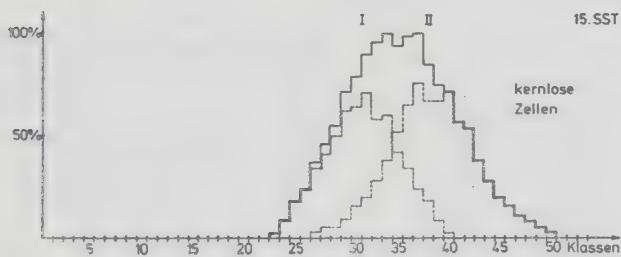
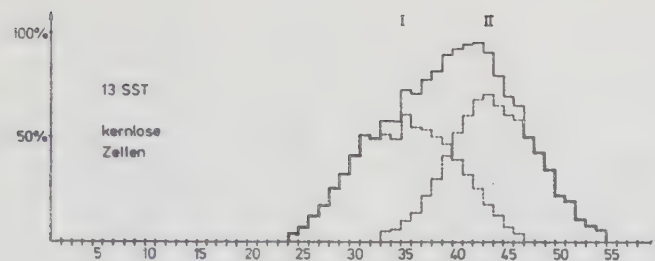


Abb. 13 a-d: Die analysierten Volumenverteilungskurven kernloser Zellpopulationen bei der Ratte zwischen dem 13. und 19 Schwangerschaftstag. Ordinate: häufigster Wert entspricht 100 %; Abszisse: Klassenbreite $5,5 \pm 0,15 \mu\text{m}^3$.

Abb. 14 a)

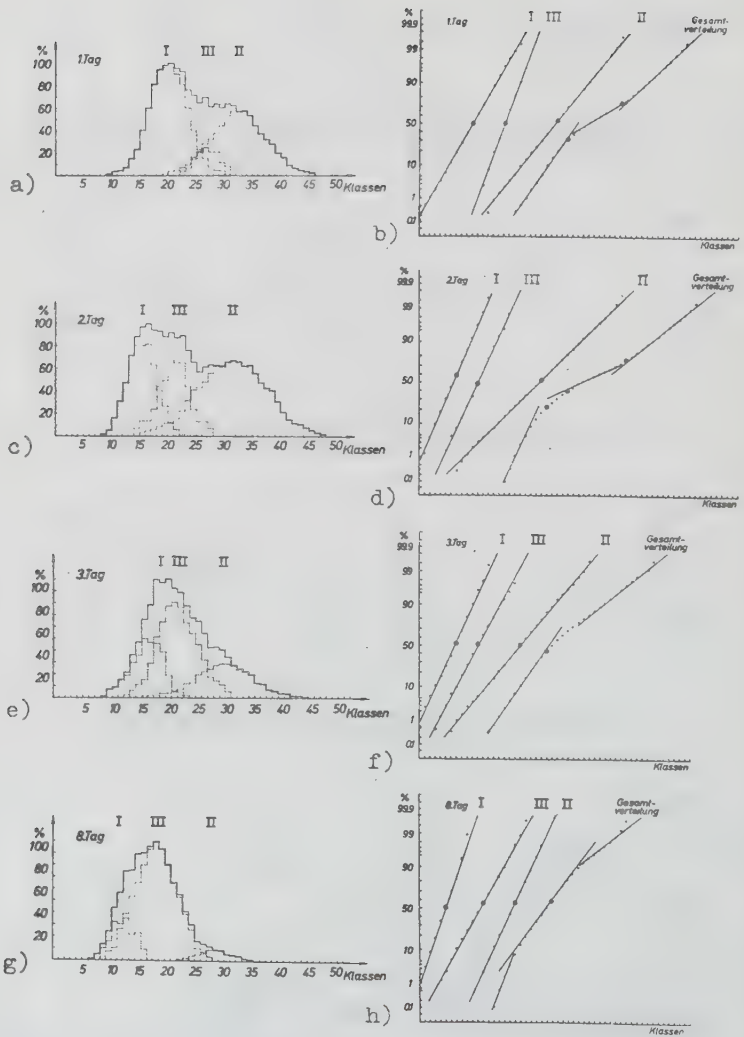


Abb. 14 a-q: Die einzelnen Populationen sind hier im Verlauf ihres zeitlichen Auftretens mit I bis V bezeichnet.

b.w.

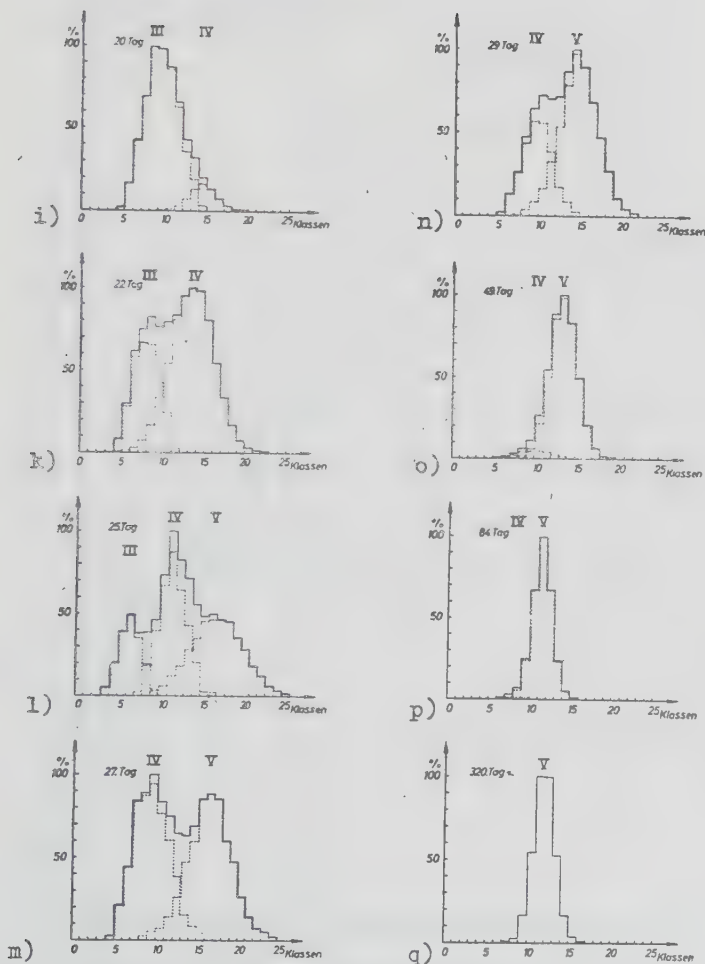


Abb.14 a-q: Analyalisierte Volumenverteilungskurven kernloser Zellpopulationen zwischen dem 1. und 320. Tag nach Geburt bei der Ratte, sowie Darstellung der Gesamt- und Einzelpopulationen im linearen Wahrscheinlichkeitsnetz. Ordinate: häufigster Wert entspricht 100%; Klassenbreite $5,5 \pm 0,15 \mu m^3$. (78)

Die %-Anteile der Einzelpopulationen an der Gesamtverteilung								
Tag	Kernhaltige Zellpopulationen			Kernlose Zellpopulationen				
	Pop. I	Pop. II	Pop. III	Pop. I	Pop. II	Pop. III	Pop. IV	Pop. V
pränatal	9.	53,4	20,0	26,6				
	11.	38,0	56,0	8,0				
	13.		90,6	9,4	50,0	50,0		
	15.		100,0		45,2	54,8		
	17.				48,0	52,0		
	19.				52,4	47,6		
Neu- geboren	1.				50,6	49,4		
postnatal	2.				27,2	50,9	21,9	
	3.				24,2	26,3	49,5	
	8.				16,9	6,1	77,0	
	14.				1,6	6,8	91,6	
	15.					8,0	92,0	
	18.					2,5	97,5	
	20.						98,4	11,6
	22.						99,6	70,4
	24.						91,6	24,6
	25.						48,7	37,6
	27.							40,7
	29.							32,9
	31.							22,9
	46.							7,0
	80.							2,4
	320.							100,0

Tab. 1: Die prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen dem 9. Schwangerschaftstag und dem 320. Tag nach der Geburt bei der Ratte.

Tag	Kernhaltige Zellpopulationen						Kernlose Zellpopulationen					
	Gesamt-population		Population I		Population II		Gesamt-population		Population I		Population II	
	MCV μm^3	VE %	MCV μm^3	VE %	MCV μm^3	VE %	MCV μm^3	VE %	MCV μm^3	VE %	MCV μm^3	VE %
9.	599,8	24,4	479,8	11,9	628,3	10,5	763,0	15,7				
11.	517,0	16,1	448,5	11,4	539,3	11,5	695,3	13,9				
13.	520,8	16,5			528,6	13,6	669,0	10,2				
15.	476,0	14,3			476,0	14,6						
17.												
19.												
postnatal												
1.												
2.												
3.												
6.												
14.												
15.												
16.												
20.												
22.												
24.												
25.												
27.												
29.												
31.												
46.												
84.												
320.												

Tab. 2 : Die mittleren Zellvolumina und die Variationskoeffizienten der analysierten Einzelpopulationen in verschiedenen Lebensaltern bei der Ratte.

Anfangsvolumen verlieren (Tab. 2).

Die Variationskoeffizienten der einzelnen Populationen zeigen während der Erythropoese unterschiedliches Verhalten: Bei der kernhaltigen Population III und der kernlosen Endpopulation V zeigt er die Tendenz zur Abnahme, bleibt etwa gleich bei der kernhaltigen Population I sowie den kernlosen Populationen I, III und IV und nimmt sowohl bei der kernhaltigen als auch bei der kernlosen Population II deutlich zu. Am 84. Tag hat der Variationskoeffizient der Endpopulation V sein Minimum erreicht und ändert sich nicht mehr (Tab. 2).

Maus: Die Morphologie der Zellen zeigt während der Erythropoese keine signifikanten Unterschiede zur Ratte. In den Ausstrichpräparaten lassen sich die gleichen Zellformen sowohl bei den kernhaltigen als auch den kernlosen Populationen nachweisen (Abb. 8-10). Auch die zeitliche Folge für das Verschwinden der kernhaltigen und das Auftreten der kernlosen Zellpopulationen entspricht sich bei Maus und Ratte bis auf den Unterschied, daß sich bei den kernlosen Zellen die zunächst bestehende Anisocytose und Poikilocytose schneller zurückbildet, und am 32. Tag nach Geburt eine, im Vergleich zur adulten Maus, weitgehende Normalisierung der Zellen in Form und Größe eingetreten ist.

Im Gegensatz zu dieser morphologischen Übereinstimmung der Zellen bei Maus und Ratte stehen die Volumenverteilungskurven. Insgesamt lassen sich bei der Maus nur 6 Populationen während der Erythropoese nachweisen: Übereinstimmend mit der Ratte zunächst 3 kernhaltige Zellpopulationen zwischen dem 9. und 16. Schwangerschaftstag (Abb 15a-d), dann aber nur 3 Populationen kernloser Zellen vom 13. Schwangerschaftstag bis zum

Erwachsenenalter (Abb. 16a-d; 17a-k). Auch diese Populationen nehmen im Laufe der Entwicklung in typischer Weise zu und ab (Abb. 18a,b) und bleiben ebenfalls zu jedem Zeitpunkt mit guter Näherung Gauß'-verteilt.

Die Kurvenanalyse der Volumenverteilungen vom 9. Schwangerschaftstag ergibt 3 kernhaltige Zellpopulationen. Dabei hat Population I mit 47,2 % zunächst den größten Anteil, während Population II und III mit 25,5, % bzw. 28,3 % kleinere, etwa gleich große Anteile an der Gesamtpopulation haben (Tab.3).

Die mittleren Zellvolumina dieser kernhaltigen Einzelpopulationen liegen am 9. Schwangerschaftstag für Population I bei $392,9 \mu\text{m}^3$, für Population II bei $482,7 \mu\text{m}^3$ und für Population III bei $628,6 \mu\text{m}^3$ (Abb. 4a). Unter einem Volumenverlust von etwa 10 % verschwinden diese Populationen aber wieder aus der Blutbahn: Population I ist bereits nach dem 11. Schwangerschaftstag, Population III nach dem 13. Schwangerschaftstag und Population II nach dem 15. Schwangerschaftstag im foetalen Blut nicht mehr nachweisbar (Tab.3).

Analog zu den Verhältnissen bei der Ratte werden ab dem 13. Schwangerschaftstag auch kernlose Zellpopulationen in die Blutbahn ausgeschwemmt, wobei Population I mit 57,5 % bereits einen um 15 % größeren Anteil an der Gesamtpopulation hat als Population II mit 42,5 %. In den folgenden prae- und postnatalen Tagen nimmt der prozentuale Anteil von Population I noch bis zum 2. Tag post partum zu, während Population II bereits nach dem 3. Tag post partum nicht mehr in der Blutbahn nachzuweisen ist. Am 2. Tag nach Geburt wird eine weitere Population III, die sich noch mit Population I und II überlappt, in den Kreislauf ausgeschwemmt. Nach dem Verschwinden der Zellpopulation I am 32. Tag stellt dann Population III

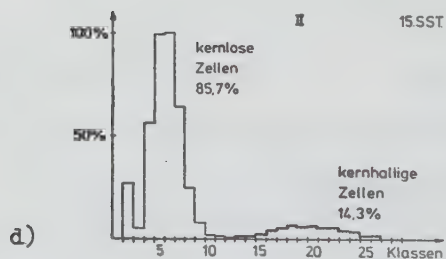
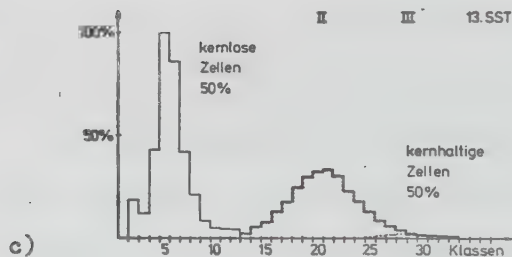
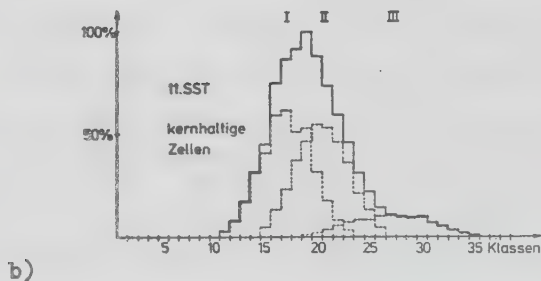
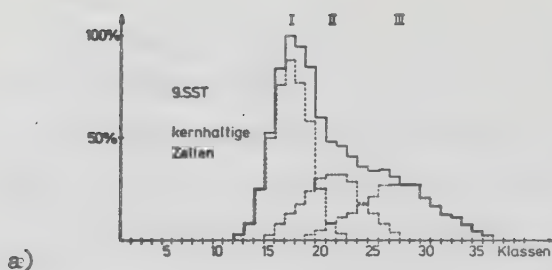


Abb.15 a-d: Die analysierten Volumenverteilungskurven kernhaltiger Zellpopulationen bei der Maus zwischen dem 9. und 15. Schwangerschaftstag. Ordinate: häufigster Wert entspricht 100%; Abszisse: Klassenbreite $22,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^3$.

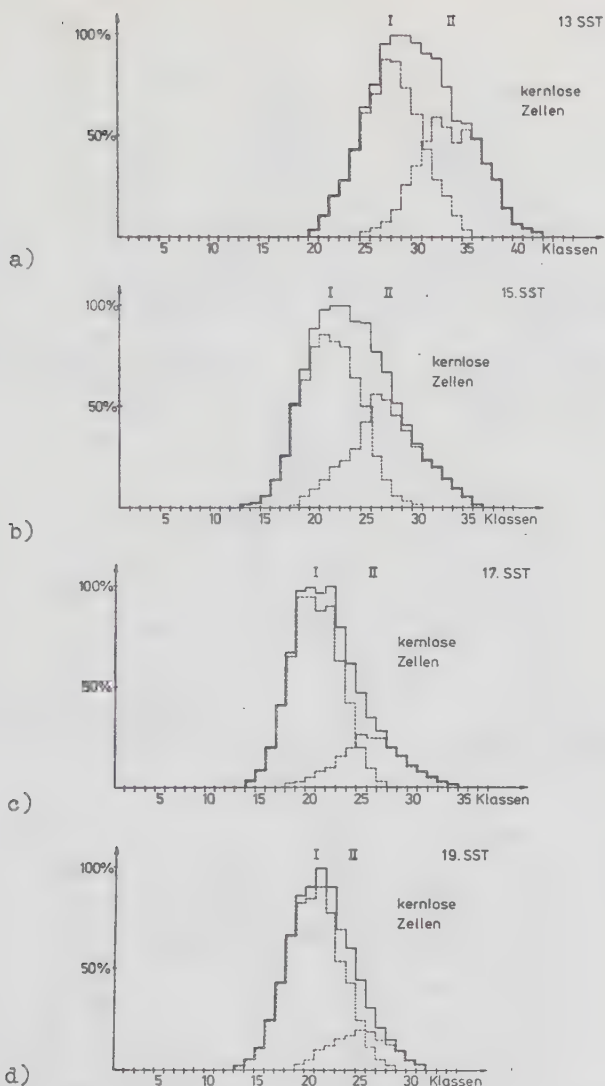
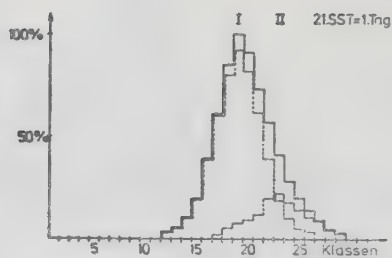
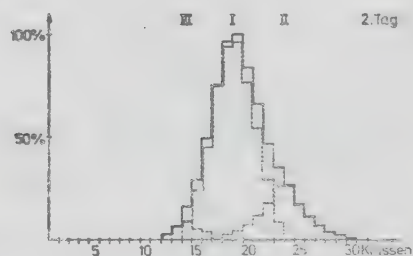


Abb.16 a-d: Analysierte Volumenverteilungskurven kernloser Zellpopulationen zwischen dem 13.und 19.Schwangerschaftstag bei der Maus. Ordinate:häufigster Wert entspricht 100%;Abszisse:Klassenbreite $5,5 \pm 0,15 \mu\text{m}^3$. Die Bezeichnung der Populationen I und II ist willkürlich gewählt.

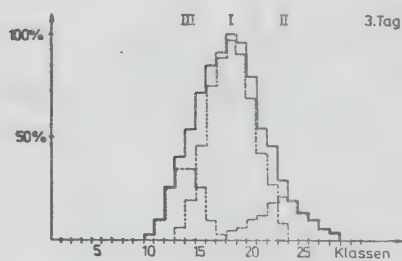
Abb. 17 a



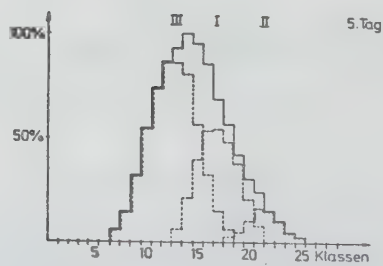
b)



c)



d)



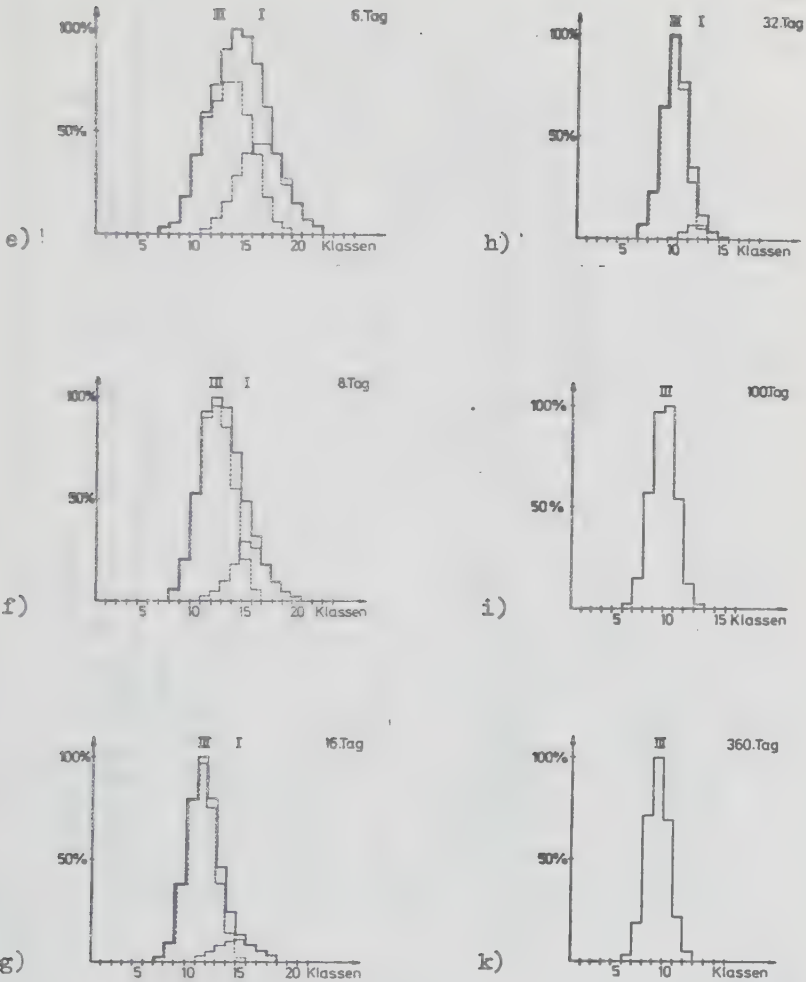


Abb. 17 a-k: Die analysierten Volumenverteilungskurven kern-
loser Zellpopulationen zwischen dem 1. und
360.Tag nach Geburt bei der Maus. Ordinate: häufigster
Wert entspricht 100%; Abszisse: Klassenbreite
 $5,5 \pm 0,15 \mu\text{m}^3$.

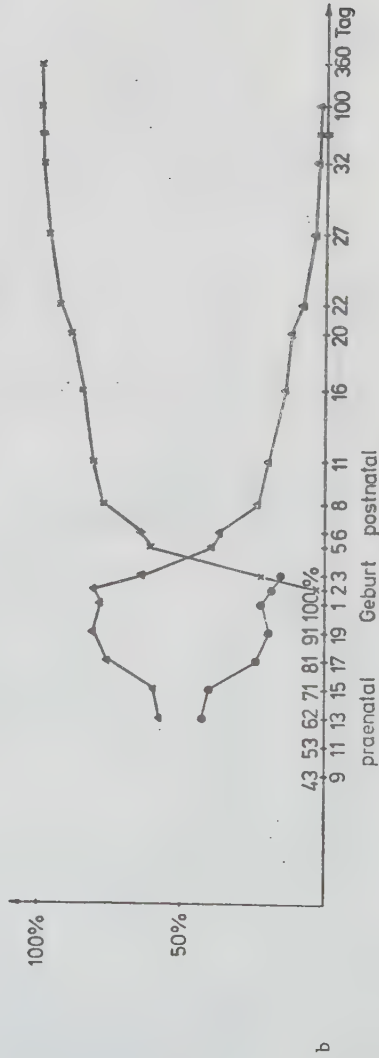
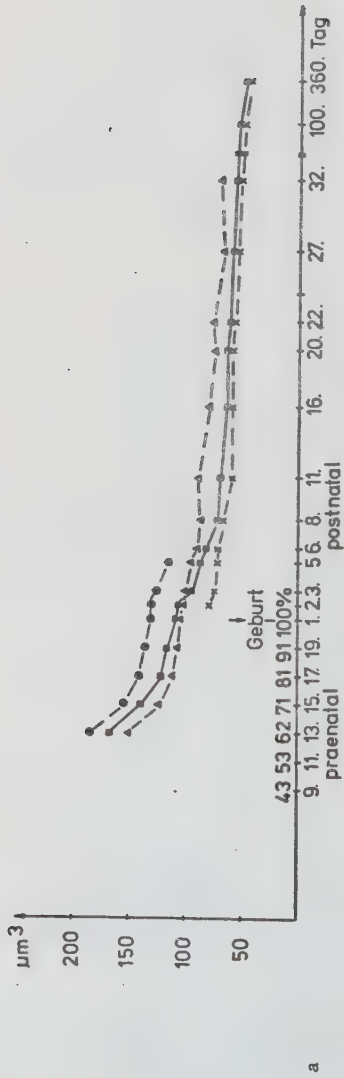


Abb. 18a: Die mittleren Zellvolumina der einzelnen kernlosen Zellpopulationen in verschiedenen Lebensaltern bei der Maus.
 Abb. 18b: Die prozentualen Anteile dieser Populationen jeweils zum gleichen Zeitpunkt.
 Abszisse: Die Schwangerschaftstage sind auch als %-Wert der Tragzeit (21 Tage=100%) angegeben.
 ... Population I; ... Population II; ... Population III.

Die %-Anteile der Einzelpopulationen an der Gesamtverteilung						
Tag	kernhaltige Zellpopulationen			kernlose Zellpopulationen		
	Pop I	Pop II	Pop III	Pop I	Pop II	Pop III
praenatal	9.	47,2	25,5	28,3		
	11.	43,1	40,0	16,9		
	13.		96,6	3,4	57,5	42,5
	15.		100,0		60,0	40,0
	17.				76,2	23,8
	19.				80,8	19,2
Neu- Geboren				77,9	22,1	
postnatal	2.			80,0	18,2	1,8
	3.			63,7	14,6	21,7
	5.			39,4		60,6
	6.			36,4		63,6
	8.			22,6		77,4
	11.			19,3		80,7
	16.			13,5		84,5
	20.			10,9		89,1
	22.			7,3		92,7
	27.			3,1		96,9
	32.			1,9		98,1
	100.					100,0
	360.					100,0

Tab. 3: Die prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen zwischen dem 9.Schwangerschaftstag und dem 360.Tag nach Geburt bei der Maus.

Tag	Kernhaltige Zellpopulationen						Kernlose Zellpopulationen					
	Gesamt- Population		Population I		Population II		Gesamt- population		Population I		Population II	
	MCV μm^3	VZ %	MCV μm^3	VK %	MCV μm^3	VK %	MCV μm^3	VZ %	MCV μm^3	VK %	MCV μm^3	VK %
9.	477,7	22,9	392,9	11,2	482,7	11,8						
11.	452,0	23,6	386,5	11,9	462,0	11,0						
13.	458,0	16,3			451,0	15,1	167,4	18,2	151,4	15,9	183,9	12,0
15.	430,8	17,1			430,8	17,1	139,0	20,6	123,8	15,9	154,8	15,1
17.							123,4	19,5	113,5	14,5	143,1	14,5
19.							118,3	19,4	107,0	16,1	138,0	13,7
Neu- geborener							108,8	19,7	105,3	16,2	133,4	13,4
2.							106,3	18,8	104,5	15,3	132,1	12,3
3.							95,9	19,3	98,3	15,4	126,6	12,3
5.							88,3	21,1	96,2	15,7	117,1	
6.							82,1	20,9	91,0	18,2		
8.							72,2	21,8	86,4	14,4		
11.							70,3	20,9	89,3	14,5		
16.							65,9	18,7	81,0	15,2		
20.							66,3	19,1	75,2	15,1		
22.							62,7	17,8	76,8	14,7		
27.							60,2	17,5	68,3			
32.							57,4	16,9	70,2			
100.							53,5	13,9				
360.							49,8	13,2				

Tab.4 : Die mittleren Zellvolumina und die Variationskoeffizienten der analysierten Einzel-
verteilungen zwischen dem 9.Schwangerschaftstag und dem 360.Tag nach Geburt bei der Maus.

mit 100 % bereits die Endpopulation dar (Tab. 3, Abb. 18b). Die mittleren Zellvolumina der am 13. Schwangerschaftstag auftretenden kernlosen Zellpopulationen sind $151,4 \mu\text{m}^3$ für Population I und $183,9 \mu\text{m}^3$ für Population II. Sie liegen etwa übereinstimmend bei $165 \mu\text{m}^3$, während die später ausgeschwemmte Zellpopulation III ein wesentlich kleineres Anfangsvolumen von $79,4 \mu\text{m}^3$ aufweist. Im Laufe der fortschreitenden Erythropoese nimmt das mittlere Zellvolumen aller 3 Populationen ab: Population I verliert 54 %, Population II 36 % und Population III 37 % des Anfangsvolumen bis zu ihrem Verschwinden aus der Blutbahn bzw. bis zum Erreichen des dem Erwachsenenalter entsprechenden Endvolumen (Tab. 4, Abb. 18a).

Unterschiedliche Tendenz zeigen die Variationskoeffizienten der Einzelpopulationen während der Reifung der Blutzellen. Es besteht aber eine Analogie zu den Verhältnissen bei der Ratte: Abnehmende Tendenz zeigt der Variationskoeffizient sowohl bei der kernhaltigen als auch bei der kernlosen Zellpopulation III, bleibt etwa gleich bei der kernhaltigen Population I und den kernlosen Populationen I und II, zeigt zunehmende Tendenz nur bei der kernhaltigen Population II. Am 32. Tag hat der Variationskoeffizient der Endpopulation III sein Minimum praktisch erreicht und ändert sich fast nicht mehr (Tab. 4).

Mensch: Auf Grund der medizinisch-technischen Schwierigkeiten (siehe Methodik) konnten beim Menschen nur 3 Zeitabschnitte der foetalen Blutbildung untersucht werden: 1 Foetus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche und Frühgeborene der 28. bis 36. Schwangerschaftswoche. Postnatal wurden die Erythrocyten des Neugeborenen, des 10 Tage alten Säuglings sowie von 40-jäh-

rigen Erwachsenen gemessen.

Die Morphologie der Blutzellen aus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ist gekennzeichnet durch die hochgradige Anisocytose und Poikilocytose: Neben kugelförmigen Zellen sind auch solche mit erst angedeuteter Eindellung zu beobachten, andere sind bereits napf- bis glockenförmig. Trotz der ausgeprägten Vielfalt an unterschiedlichen Zellformen und -größen lassen sich aber vereinzelt auch deutlich größere, kugelförmige Zellen mit und ohne Eindellung darstellen (Abb. 19a,b; 20a,b). Diese Zellen sind später nicht mehr nachweisbar. Bestehen bleibt die Anisocytose, die sich nur sehr langsam im Laufe der Entwicklung zurückbildet und erst im 4. Trimenon völlig ausgeglichen ist.

Die Volumenverteilungskurve foetaler Blutzellen aus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ergibt neben einer wahrscheinlich präparativ bedingten Zellpopulation, deren mittleres Volumen dem der mütterlichen Erythrocyten entspricht, 2 foetale Zellpopulationen (Abb. 21a). Ein Ausstrichpräparat dieser Blutprobe konnte nicht angefertigt werden. Die in der Literatur beschriebenen morphologischen Befunde weisen aber darauf hin, daß zu diesem Zeitpunkt der größte Teil der roten Zellen bereits kernlos ist, und kernhaltige Zellen nur noch in geringen Mengen in der peripheren Blutbahn nachzuweisen sind. Es kann also angenommen werden, daß Population I kernlosen Zellen und Population II kernhaltigen Zellen entsprechen.

Das mittlere Zellvolumen der Population I beträgt $151,2 \text{ um}^3$. Sie stellt mit einem Anteil von 94 % an der Gesamtpopulation

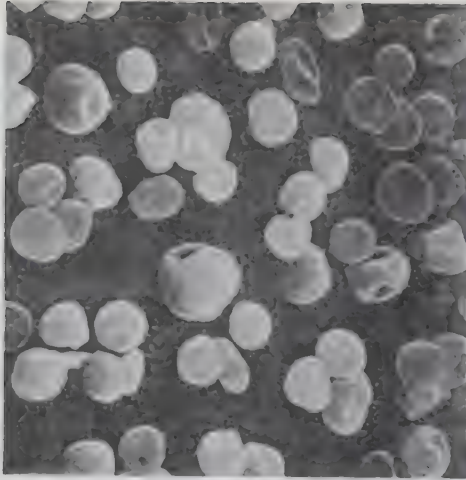


Abb. 19: Morphologie der roten Zellen im peripheren Blut des menschlichen Foeten im Rasterelektronenmikroskop, Vergrößerung 2000-fach.

- a) in der 14.Schwangerschaftswoche
- b) bei Geburt

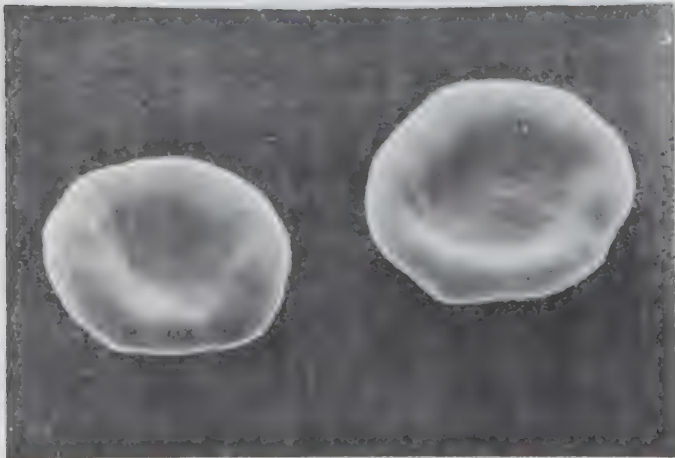
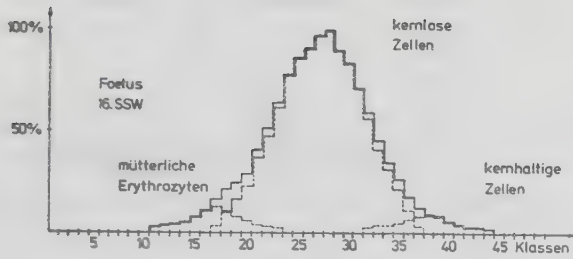


Abb. 20a :Menschliche Erythrocyten vom Neugeborenen :Über-
gang der kugelförmigen zur bikonkaven Zellform.

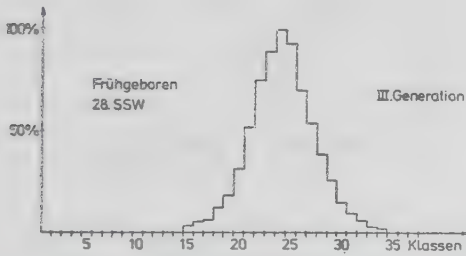
Abb. 20b :Erythrocyten des erwachsenen Menschen.

Rasterelektronenmikroskop, Vergrößerung 5000-fach.

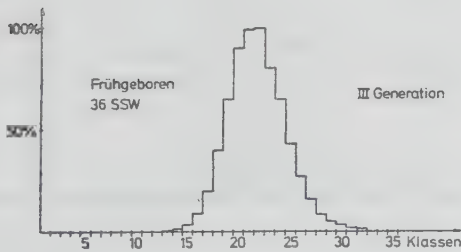
Abb. 21 a



b



c



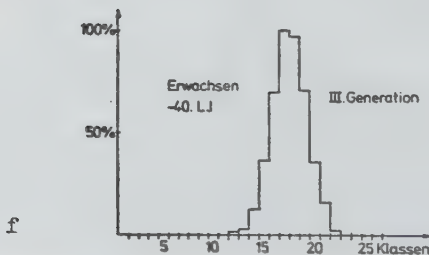
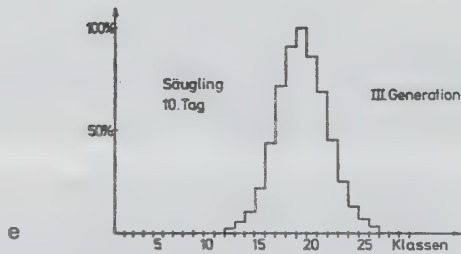
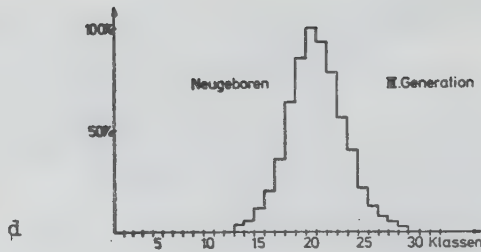


Abb.21 a-f : Analysierte Volumenverteilungskurven roter Blutkörperchen vom Menschen in verschiedenen Lebensaltern. Ordinate: häufigster Wert entspricht 100%; Abszisse: Klassenbreite $5,5 \pm 0,15 \mu\text{m}^3$.

bereits die endgültige Erythrocytenpopulation dar. Für die kernhaltigen Zellen der Population II konnte bisher kein Formfaktor (siehe Methodik) bestimmt werden. Nimmt man hypothetisch aber einen Formfaktor zwischen 1,3 und 1,5 an, haben Population I und II etwa gleiche mittlere Zellvolumina.

Bis zur Geburt in der 40. Schwangerschaftswoche wird das mittlere Zellvolumen der Population I um 25 % und bis zum 40. Lebensjahr um 36 % kleiner als das Anfangsvolumen in der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche (Tab. 5). Die Volumenverteilungskurven sämtlicher Blutproben nach der 16. Schwangerschaftswoche ergaben jeweils nur eine normalverteilte Zellpopulation, deren Variationskoeffizient mit zunehmender Reifung des menschlichen Organismus um etwa 40 % kleiner wird (Tab. 5, Abb. 21 b-f; 22a,b).

Alter	Population I			Population II		
	%-Anteil	MCV μm^3	VK %	%-Anteil	MCV μm^3	VK %
Foetus, 16. SSW	94,0	151,2	19,8	6,0	210,3 (kernlos)	8,5
Frühgeboren, 28. SSW	100,0	134,6	15,9		154,0 (kernhaltig) F = 1/4	
Frühgeboren, 36. SSW	↓	122,1	17,1			
Neugeborenen		113,4	16,6			
Postnatal, 10. Tag		104,5	14,9			
Postnatal, 40. Lj.		97,2	11,6			

Tab. 5: Die mittleren Zellvolumina und Variationskoeffizienten der analysierten Einzelpopulationen beim Menschen in verschiedenen Lebensaltern.

Besprechung

Viele morphologische Befunde weisen sowohl bei der normalen Erythropoese als auch bei den genetisch bedingten oder experimentell erzeugten Fehlsteuerungen der Erythropoese auf verschiedene Erythrocytenpopulationen bei der gleichen Spezies hin (2,11,23,29,46,93). Da bisher eine exakte zyto-metrische Volumenbestimmung nativer Zellen nicht möglich war, wurde bei der Erythropoese der Säuger nur zwischen einer embryonalen kernhaltigen und einer foetalen bzw. adulten kernlosen Zellpopulation unterschieden. Das Auftreten kernloser, unreifer Zellformen des erythropoetischen Systems in der peripheren Blutbahn wurde als Makrocytose oder Retikuloctyose bezeichnet.

Mit Hilfe des elektronischen Partikelstrahlverfahrens, das eine wesentlich größere Meßgenauigkeit aufweist als die bislang in der quantitativen Morphologie angewandten histologisch-planimetrischen Meßverfahren, kann das mittlere Zellvolumen nativer roter Blutkörperchen direkt gemessen werden. Durch das große Auflösungsvermögen des elektronischen Meßverfahrens war es erstmals möglich, während der Entwicklung des erythropoetischen Systems sowohl bei den kernhaltigen als auch bei den kernlosen Zellen verschiedene Erythrocytenpopulationen in der peripheren Blutbahn nachzuweisen. Diese Zellpopulationen werden in zeitlich festgelegter Reihenfolge in die Blutbahn geschwemmt. Ihre prozentualen Anteile an der Gesamtzahl der im Blut vorhandenen roten Zellen nehmen während der Reifung des erythropoetischen Systems bis zum

Auftreten der endgültigen Erythrocytenpopulation in charakteristischer Weise zu und ab. Diese genetisch festgelegte Populationskinetik ist unterschiedlich und weist auf verschiedene Erythropoesemechanismen während der stammesgeschichtlichen Entwicklung dieser Spezies hin. Die bereits bekannten Tatsachen, daß 1. die roten Blutkörperchen in zeitlich festgelegter Reihenfolge zunächst vom embryonalen Mesenchym des Dottersacks, des Chorions und des Bauchstiels, dann von der Leber, der Milz und dem Knochenmark gebildet werden (10,41,44,49,50,89) und daß 2. die Ratte in der stammesgeschichtlichen Entwicklung im Vergleich zur Maus und diese wiederum im Vergleich zum Menschen eine relativ junge Spezies darstellt (49,50,88,89) werfen im Zusammenhang mit den neuen zytometrischen Ergebnissen die Frage nach der Herkunft und der Bedeutung, sowie dem genetischen Regulationsmechanismus dieser Erythrocytenpopulationen auf.

Da die Zellen des embryonalen Mesenchyms, die sogenannten primitiven Megaloblasten, bei allen Säugern wohl eine Sonderstellung einnehmen, sollen die entsprechenden zytometrischen Befunde an dieser Stelle gesondert besprochen werden. Die Zellen dieser Generation sind zunächst alle kernhaltig. Zytometrisch lassen sich bei Ratte und Maus am 9. und 11. Schwangerschaftstag drei kernhaltige Zellpopulationen in der peripheren Blutbahn nachweisen. Unklar bleibt, ob diesen drei kernhaltigen Zellpopulationen drei genetische Code zu Grunde liegen. Wahrscheinlicher ist es, und dafür sprechen die bislang bekannten morphologischen Befunde, daß diese kernhaltigen

Zellpopulationen, entsprechend dem rhythmischen Wachstum der Kerne, nur verschiedene Reifungsstufen derselben Zellgeneration darstellen (8,9,23,47,92). Die ersten Blutzellen entstehen nämlich zunächst diffus im Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel und bilden später im Keimling selbst die sogenannten Blutinseln. Diese Blutinseln verbinden sich miteinander und bilden sich um, indem die äußeren Zellen zu Gefäßendothelien, die inneren Zellen zu den ersten Blutzellen werden. Das Verschwinden dieser kernhaltigen Zellpopulationen aus der Blutbahn zwischen dem 13. und 16. Schwangerschaftstag und das gleichzeitige Auftreten kernloser Zellen in der Peripherie kann bedeuten, daß a) die intravaskuläre Zellbildung beendet ist und b) daß das erythropoetische System eine genetische Information erhalten hat, nur noch kernlose Zellen in die Blutbahn auszuschwemmen. Dabei schließt das Verschwinden der kernhaltigen Zellen aus der Blutbahn nicht aus, daß sich das embryonale Mesenchym auch weiterhin an der Blutbildung beteiligt und kernlose Zellen in die periphere Blutbahn ausschwemmen kann. Dies kann zu einem späteren Zeitpunkt sogar bewiesen werden. (Seite 56,58,61,63).

Hinsichtlich der genetischen Information, die die Kinetik der kernlosen Zellpopulationen während der Reifung des erythropoetischen Systems regeln, lassen die morphologischen Befunde der blutbildenden Organe einerseits und die entsprechenden zytometrischen Ergebnisse der verschiedenen Erythrocytenpopulationen im peripheren Blut andererseits zwei Deutungen offen:

Theorie I: Die gesamte Erythropoese der Säuger wird nur durch eine zeitabhängige Codefolge geregelt. Sie regt in zeitlich

festgelegter Reihenfolge die verschiedenen Organe des erythropoetischen Systems zur Neubildung von Zellen an. Dabei produziert jedes blutbildende Organ jeweils eine organspezifische Erythrocytenpopulation. Voraussetzungen für eine solche Zuordnung einzelner Erythrocytenpopulationen zu bestimmten Blutbildungsorganen sind: a) eine organspezifische Zellpopulation darf nur dann in der peripheren Blutbahn nachgewiesen werden, wenn das entsprechende Organ schon zu einem früheren Zeitpunkt mit der Zellproduktion begonnen hat, und b) nach Beendigung der Zellproduktion in diesem Organ muß auch die entsprechende Zellpopulation wieder aus der Blutbahn verschwinden.

Theorie II: Die Erythropoese der Säuger wird durch zwei, ebenfalls zeitabhängige, Codefolgen geregelt: a) Der erste Code legt die zeitliche Reihenfolge fest, in der sich die blutbildenden Organe an der Erythropoese beteiligen. 1. Embryonales Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel, 2. Leber, 3. Milz, 4. Knochenmark: b) Der Code bewirkt in den an der Erythropoese beteiligten Organen in zeitlich festgelegter Reihenfolge die Produktion einer neuen, für diesen Code charakteristischen Erythrocytenpopulation. Voraussetzungen sind dabei, daß: 1. Das erythropoetische System der einzelnen Organe fähig ist, verschiedene rote Zellpopulationen gleichzeitig zu bilden, und daß: 2. Der Code die Zellproduktion zeitlich begrenzt.

Für den Zeitpunkt des Auftretens und wieder Verschwindens einer Zellpopulation muß für beide Theorien folgendes berücksichtigt werden: 1. Die neugebildeten Zellen benötigen zunächst eine

bestimmte Zeit, in der sie von einer kernhaltigen zu einer kernlosen Zelle reifen und 2. bei der erstmaligen Produktion einer Zellpopulation ist es immerhin denkbar, daß das blutbildende Organ zunächst ein gewisses Reservoir an Zellen bildet, bevor es die ersten kernlosen Zellen in die Blutbahn ausschwemmt. Dies bedeutet, daß sowohl zwischen dem Beginn der Zellproduktion und der Ausschwemmung der Zellen als auch zwischen dem Ende der Zellproduktion und dem Verschwinden dieser Zellpopulation ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Zeitintervall liegen muß, das bei den verschiedenen Organen auch unterschiedlich lang sein kann.

Ratte

Über den Beginn und die Dauer der embryonalen Blutbildung sind in der Literatur keine genauen Angaben zu finden. Bekannt ist, daß sich die Leber ab dem 15. Schwangerschaftstag an der Bildung roter Blutzellen beteiligt und etwa bis zum 10. Tag nach Geburt erythropoetisch aktiv bleibt. Gleichzeitig zum Zeitpunkt der Geburt beginnt die Erythropoese in der Milz und im Knochenmark. In beiden Organen erreicht sie zwischen dem 8. und 10. Tag ein Maximum und nimmt in den folgenden Tagen wieder ab. In der Milz ist nach dem 40. Tag keine Erythropoese mehr nachweisbar. Zwischen dem 40. und 60. Tag erreicht das erythropoetische System im Knochenmark sein endgültiges Reifestadium und gleicht ab diesem Zeitpunkt dem der adulten Ratte (11,16,49,50).

Das morphologische Bild der peripheren Blutzellen weist am 9. und 11. Schwangerschaftstag nur kernhaltige Zellen auf. Am 12. Schwangerschaftstag erscheinen die ersten kernlosen Zellen,

deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der im Blut vorhandenen roten Zellen rasch zunimmt. Am 13. Schwangerschaftstag sind es bereits 45 % und am 15. Schwangerschaftstag annähernd 100 %, d.h., daß bis zu diesem Zeitpunkt alle kernhaltigen Zellen aus der Blutbahn verschwunden sind. Die kernlosen Zellen sind nach ihrem Erscheinen in der Blutbahn zunächst kugelförmig, später napf- bis glockenförmig. Diese ausgeprägte Anisocytose und Poikilocytose bildet sich nur sehr langsam zurück. Erst zwischen dem 60. und 80. Tag nach Geburt hat sich das rote Blutbild soweit normalisiert, daß es dem der adulten Ratte weitgehend gleicht.

Die Volumenverteilungskurven der kernlosen Zellen aus peripherem Blut ergeben am 13. Schwangerschaftstag zwei Populationen, deren prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation etwa gleich groß sind und ändern sich bis zur Geburt nicht. Nach der Geburt werden die Anteile dieser Populationen kleiner und sind nach dem 14. bzw. 18. Tag fast völlig aus der Blutbahn verschwunden. Zum Zeitpunkt der Geburt ist aber eine neue Zellpopulation III im peripheren Blut nachweisbar. Ihr prozentualer Anteil nimmt rasch zu und bildet vom 8. bis 20. Tag den Hauptanteil der im Blut vorhandenen roten Zellen. Bis zum 24. Tag ist diese Zellpopulation aber wieder aus der Blutbahn verschwunden. Vom 20. Tag bis etwa zum 60. Tag schließlich erscheint die endgültige Zellpopulation V, deren Anteil an der Gesamtpopulation am 49. Tag bereits über 95 % ausmacht.

Die Frage ist nun, ob zwischen diesen verschiedenen Erythrocytenpopulationen und den ebenfalls verschiedenen Blutbildungsstätten ein Zusammenhang möglich ist und welche genetische Codefolge diesem komplexen Erythropoesemechanismus zu Grunde liegen kann.

Theorie I: Da die Leber erst ab dem 15. Schwangerschaftstag mit der Bildung roter Zellen beginnt, können diese erst zu einem späteren Zeitpunkt als kernlose Zellen in der Blutbahn erscheinen. Am 13. Schwangerschaftstag sind aber bereits zwei kernlose Zellpopulationen in der Blutbahn nachweisbar, die dementsprechend aus einer früheren, d.h. der embryonalen Blutbildungsphase stammen müssen. Die Tatsache, daß die prozentualen Anteile dieser Zellpopulationen I und II bis zur Geburt etwa gleich groß bleiben und erst nach Geburt abnehmen, wenn Dottersack, Chorion und Bauchstiel für die Bildung roter Zellen nicht mehr in Frage kommen, deutet darauf hin, daß sich das embryonale Mesenchym bei der Ratte bis zur Geburt an der Erythropoese beteiligt und kernlose Zellen in die Blutbahn ausschwemmt. Das Verschwinden der kernhaltigen Zellen aus dem peripheren Blut ist also entgegen der bisherigen Meinung nicht mit dem Ende der mesenchymalen embryonalen Blutbildung gleichzusetzen.

Zum Zeitpunkt der Geburt erscheint in der Blutbahn die Population III. Vorausgesetzt, daß die ab dem 15. Schwangerschaftstag in der Leber gebildeten Zellen innerhalb von 6 Tagen zu kernlosen Zellen reifen und in die Blutbahn ausgeschwemmt werden, ist eine Zuordnung der Population III zur hepatischen Blutbildungsphase denkbar. Da sich die Leber nur bis zum 10. Tag nach Geburt an der Erythropoese beteiligt, muß dann auch die ihr entsprechende Zellpopulation III in den folgenden Tagen aus der Blutbahn verschwinden. Population III ist nach dem 25. Tag nicht mehr in der Blutbahn nachzuweisen. Dementsprechend dürfen die Zellen dieser Generation nur eine

Lebensdauer von etwa 9 Tagen im peripheren Blut haben.

Die Milz beginnt zum Zeitpunkt der Geburt mit der Bildung roter Zellen und beteiligt sich bis etwa zum 40. Tag an der Erythropoese. Im peripheren Blut ist vom 20. bis etwa 80. Tag die Zellpopulation IV nachzuweisen. Vorausgesetzt, daß die Zellen dieser Population IV einerseits innerhalb von 20 Tagen zu kernlosen Zellen ausreifen und andererseits eine Überlebenszeit von 20 Tagen in der peripheren Blutbahn haben, ist eine Zuordnung der Zellpopulation IV zur Milz denkbar. Das Knochenmark beginnt ebenfalls zum Zeitpunkt der Geburt mit der Bildung roter Blutzellen. Es ist aber bekannt, daß diese neugebildeten Zellen zwischen dem 20. und 30. Tag nach Geburt noch ein Syncytium aus kernhaltigen Zellen bilden. Erst nach dem 30. Tag beginnen die Zellen sich langsam zu differenzieren. Zwischen dem 40. und 60. Tag nach Geburt entspricht das Knochenmark dem der adulten Ratte (49,50). Dementsprechend kann die bereits am 24. Tag im peripheren Blut nachzuweisende Endpopulation V zu diesem Zeitpunkt noch nicht dem Knochenmark zugeordnet werden, sondern entspricht zunächst den Zellen aus der früheren hepatischen oder lienalen Blutbildungsperiode.

Theorie II: Wird die Erythropoese durch zwei genetische Code geregelt, dann legt die erste Codefolge die zeitliche Reihenfolge fest, in der die blutbildenden Organe an der Erythropoese teilnehmen: 1. Embryonales Mesenchym: Dottersack, Chorion, Bauchstiel (unbekannt), 2. Leber (15. Tag vor bis 10. Tag nach Geburt), 3. Milz (1. bis 40. Tag) und 4. Knochenmark (ab Geburt). Die zweite Codefolge bewirkt in zeitlich festgelegter Reihenfolge in den zu diesem Zeitpunkt aktiven

Organen des erythropoetischen Systems die Bildung einer neuen Zellpopulation, die zu einem späteren Zeitpunkt in die periphere Blutbahn ausgeschwemmt wird. Anfang und Ende dieser genetischen Information sind bisher unbekannt.

Am 13. Schwangerschaftstag sind zwei kernlose Zellpopulationen in der peripheren Blutbahn nachweisbar. Die genetischen Informationen I und II haben also bereits vor dem 13. Schwangerschaftstag das blutbildende Gewebe zur Produktion der Zellpopulationen I und II angeregt. Zu diesem Zeitpunkt ist aber nur das embryonale Mesenchym an der Erythropoese beteiligt. Dies bedeutet aber, daß sich das embryonale Mesenchym auch nach dem Verschwinden der kernhaltigen Zellen noch an der Blutbildung beteiligt und kernlose Zellen in die periphere Blutbahn ausschwemmt.

Gleichzeitig mit der Geburt erscheint die Zellpopulation III in der Blutbahn, die genetische Information III ist also zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt. Dies bedeutet für das embryonale Mesenchym, vorausgesetzt, daß es zu diesem Zeitpunkt überhaupt noch an der Erythropoese teilnimmt, daß es sich auch noch an der Produktion der Zellpopulation III beteiligen kann.

Die Leber beginnt am 15. Schwangerschaftstag mit der Bildung roter Blutzellen. Erfolgte die genetische Information III vor diesem Zeitpunkt, beginnt die Leber direkt mit der Produktion von Zellen der Population III. Erfolgte die genetische Information III aber zwischen dem 15. und 21. Schwangerschaftstag, dann bildet die Leber zusammen mit dem embryonalen Mesenchym zunächst noch Zellen der Population I und II und stellt

zu einem späteren Zeitpunkt die Erythropoese auf die Bildung der Zellpopulation III um.

Ab der Geburt beteiligen sich auch Milz und Knochenmark an der Erythropoese. Zusammen mit der Leber bilden sie zunächst Zellen der Population III. Am 10. Tag ist in der Leber keine Erythropoese mehr nachweisbar. Milz und Knochenmark produzieren die Zellpopulation III weiter. Vor dem 20. bzw. 24. Tag haben die genetischen Code IV und V in Milz und Knochenmark bewirkt, daß die Zellpopulation IV und die Endpopulation V gebildet werden. Da sich die Milz bis zum 40. Tag an der Blutbildung beteiligt, bedeutet dies, daß sie sich zunächst auch an der Produktion der endgültigen Erythrocytenpopulation beteiligt.

Maus

Die Blutbildung beginnt am 8. Schwangerschaftstag im embryonalen Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel und dauert etwa bis zum 12. Schwangerschaftstag. Vom 12. bis zum 16. Schwangerschaftstag beteiligt sich die Leber an der Bildung roter Blutzellen, Milz und Knochenmark folgen am 15. bzw. 16. Schwangerschaftstag (15,16,19,68,93). Wie lange sich die Milz an der Erythropoese beteiligt, ist aus der vorliegenden Literatur nicht ersichtlich. Bemerkenswert ist jedoch, daß im Gegensatz zur Ratte, sämtliche Blutbildungsorgane bei der Maus schon in der Foetalzeit mit der Blutbildung beginnen. Das morphologische Bild der Blutzellen unterscheidet sich nicht signifikant von dem der Ratte. Am 9. und 11. Schwangerschaftstag sind nur kernhaltige Zellen in der peripheren Blutbahn zu finden, und am 12. Schwangerschaftstag erscheinen die ersten kernlosen Zellen im Blut. Ihr prozentualer Anteil an

der Gesamtzahl der im Blut vorhandenen roten Zellen nimmt rasch zu und beträgt am 15. Schwangerschaftstag bereits annähernd 100 %, d.h., daß die kernhaltigen Zellen bis zu diesem Zeitpunkt fast völlig aus der Blutbahn verschwunden sind. Die sehr ausgeprägte Anisocytose und Poikilocytose bildet sich bei der Maus schneller zurück als bei der Ratte. Ab dem 32. Tag nach Geburt etwa gleicht das rote Blutbild der jungen Maus weitgehend dem der adulten.

Die Volumenverteilungskurven der kernlosen Zellen vom 13. Schwangerschaftstag, an dem sie erstmals im peripheren Blut nachweisbar sind, ergeben zwei Populationen. Während jedoch der prozentuale Anteil der kernlosen Zellpopulation II in den folgenden Tagen abnimmt, und am 3. bis 4. Tag nach der Geburt keine Zellen dieser Population mehr in der Blutbahn nachweisbar sind, nimmt der prozentuale Anteil der Zellpopulation I zu und erreicht um den 17. Schwangerschaftstag sein Maximum. Bis zum 2. Tag nach Geburt bleibt ihr prozentualer Anteil gleich, nimmt bis zum 8. Tag um etwa 75 % ab und beträgt am 32. Tag weniger als 2 %. Nach dem 32. Tag sind die Zellen dieser Population in der Blutbahn nicht mehr nachweisbar. Ab dem 2. Tag nach Geburt ist aber bereits die endgültige Erythrocytenpopulation im peripheren Blut nachweisbar. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation der roten Zellen nimmt rasch zu und beträgt am 10. Tag bereits über 80 %. Nach dem 32. Tag stellen die Zellen dieser Population mit annähernd 100 % die Gesamtzahl der im Blut vorhandenen roten Zellen dar. Wiederum stellt sich die Frage, ob diese Erythrocytenpopulationen bestimmten Blutbildungsstätten zuzuordnen sind, oder ob auch ein anderer Mechanismus diese Erythropoese

regeln kann.

Theorie I: Die Volumenverteilungskurven vom 13. Schwangerschaftstag, an dem erstmals kernlose Zellen in der peripheren Blutbahn auftreten, ergeben die Zellpopulationen I und II. Die prozentualen Anteile der Population II nehmen in den folgenden Tagen ab. Dementsprechend können die Zellen dieser Population II nur aus einem Organ stammen, das seine erythropoetische Tätigkeit zu diesem Zeitpunkt bereits beendet hat. Eine entsprechende Tendenz zeigt die Erythropoese des embryonalen Mesenchyms von Dottersack, Chorion und Bauchstiel, das nach dem 12. Schwangerschaftstag keine roten Blutzellen mehr bildet, bis zu diesem Zeitpunkt aber auch kernlose Zellen in die periphere Blutbahn ausschüttet.

Die Leber beteiligt sich ab dem 12. Schwangerschaftstag an der Erythropoese. Am 13. Schwangerschaftstag erscheint aber bereits die Zellpopulation I in der Blutbahn, deren prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation rasch zunehmen. Eine Zuordnung dieser Zellpopulation I zur hepatischen Blutbildungsphase ist also nur möglich, wenn diese Zellen innerhalb von einem Tag zu kernlosen Zellen reifen und in die Blutbahn ausgeschwemmt werden.

Diese Voraussetzung ist jedoch wenig wahrscheinlich.

Andererseits beteiligt sich die Leber nur bis zum 16. Schwangerschaftstag an der Erythropoese. Die Zellen der Population I sind aber in geringen Mengen bis nach dem 32. Tag in der peripheren Blutbahn nachzuweisen. Eine Zuordnung dieser Zellen zur hepatischen Blutbildungsphase ist also nur unter der Voraussetzung möglich, daß die Überlebensdauer dieser Zellen im peripheren Blut länger als 40 Tage ist. Auch diese Voraussetzung

ist im Vergleich mit anderen Zellpopulationen wenig wahrscheinlich.

Die Milz und das Knochenmark beginnen gleichzeitig am 15. und 16. Schwangerschaftstag. Am 2. Tag nach Geburt, also 6 bis 7 Tage später, erscheint eine neue Zellpopulation III in der Blutbahn, die gleichzeitig der endgültigen Erythrocytenpopulation entspricht. Für die endgültige Erythrocytenproduktion ist bei den Säugern aber das Knochenmark verantwortlich. Da die Milz und das Knochenmark etwa gleichzeitig mit der Bildung roter Blutzellen beginnen, ist eine solche Zuordnung zu der am 2. Tag nach Geburt auftretenden Endpopulation III nur unter den Voraussetzungen möglich, daß :

1. Die in der Milz und/oder im Knochenmark neu gebildeten Zellen nach 6 bis 7 Tagen als kernlose Erythrocyten in die Blutbahn ausgeschwemmt werden, und daß: 2. Diese Zellen sowohl in ihren mittleren Zellvolumina als auch in ihren Variationskoeffizienten übereinstimmen und eine einheitliche Zellpopulation bilden.

Theorie II: Die erste Codefolge legt wiederum die zeitliche Reihenfolge fest, in der sich die Blutbildungsorgane an der Erythropoese beteiligen, also: 1. Embryonales Mesenchym (8.-12. Schwangerschaftstag), 2. Leber (12.-16. Schwangerschaftstag), 3. Milz (ab 15. Schwangerschaftstag) und 4. Knochenmark (ab 16. Schwangerschaftstag). Die zweite Codefolge bewirkt dann in zeitlich festgelegter Reihenfolge die Bildung der Zellpopulation I, II und III in den verschiedenen Blutbildungsorganen.

Am 13. Schwangerschaftstag, an dem erstmals kernlose Zellen in der Blutbahn auftreten, ergeben die Volumenverteilungskur-

ven zwei Zellpopulationen. Während die prozentualen Anteile der Population II kleiner werden, nehmen die der Population I deutlich zu. Die genetische Information für eine Zellpopulation, die bereits wieder aus der Blutbahn verschwindet, muß aber zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt sein als für eine Population, deren Zellen zum gleichen Zeitpunkt vermehrt in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Das bedeutet, daß die erste genetische Information die Bildung der Zellpopulation II, und die zweite genetische Information die Bildung der Zellpopulation I bewirkt hat. Population II entspricht also Zellen, die vom embryonalen Mesenchym gebildet werden. Der große prozentuale Anteil der Zellpopulation I an der Gesamtpopulation, gleich nach dem Erscheinen in der peripheren Blutbahn, kann andererseits ein Hinweis sein, daß die genetischen Informationen I und II in einem kurzen zeitlichen Abstand hintereinander oder sogar gleichzeitig erfolgt sind, so daß sich das embryonale Mesenchym noch wesentlich an der Produktion der Zellpopulation I beteiligen kann.

Da die Milz und das Knochenmark bereits am 15. bzw. 16. Schwangerschaftstag mit der Bildung roter Blutzellen beginnen, werden sie, vorausgesetzt, daß die genetische Information II noch nicht beendet ist, zunächst auch an der Produktion der Zellpopulation I teilnehmen. Dafür spricht, daß die Zellen der Population I, wenn auch nur in geringen Mengen, bis zum 32. Tag nach Geburt in der peripheren Blutbahn nachzuweisen sind. Am 2. Tag nach Geburt erscheint die endgültige Erythrocytenpopulation III in der Blutbahn. Erfolgt die entsprechende genetische Information III zu einem sehr frühen Zeitpunkt in

der Schwangerschaft, beteiligen sich in zeitlich festgelegter Reihenfolge embryonales Mesenchym, Leber, Milz und Knochenmark (1. Codefolge) nacheinander an der Produktion der endgültigen Zellpopulation III. Erfolgt die genetische Information III nach dem 12. Schwangerschaftstag, ist Leber, Milz und Knochenmark an der Produktion der Endpopulation beteiligt, nach dem 16. Schwangerschaftstag nur noch Milz und Knochenmark. Der Zeitpunkt, an dem die Erythropoese in der Milz beendet ist und das Knochenmark allein die Bildung der endgültigen Erythrocytenpopulation übernimmt, ist aus der vorliegenden Literatur nicht ersichtlich.

Mensch

Die embryonale Blutbildungsphase beginnt schon sehr früh gegen Ende der zweiten Schwangerschaftswoche. Gegen Ende der 12. Schwangerschaftswoche endet diese Blutbildungsperiode. Die Leber beginnt in der 8. Schwangerschaftswoche mit der Bildung roter Blutzellen und beteiligt sich bis zum Ende der Schwangerschaft an der Erythropoese. Vorübergehend beteiligt sich auch die Milz von der 12. bis zur 28. Schwangerschaftswoche an der Blutzellbildung. Von der 20. Schwangerschaftswoche an beginnt das Knochenmark in steigendem Maße rote Zellen zu bilden und ist zum Zeitpunkt der Geburt bereits allein für die Erythropoese verantwortlich (40,44).

Das rote Blutbild weist in den ersten Schwangerschaftswochen nur kernhaltige Zellen auf. Zunächst sind es Zellen aus dem embryonalen Mesenchym, später auch aus der Leber, da die Blutzellbildung dort ebenfalls erst intravaskulär beginnt.

Nach der 12. Schwangerschaftswoche nimmt die Zahl der kern-

haltigen Zellen jedoch rasch ab. nach der 16. Schwangerschaftswoche sind sie nur noch vereinzelt in der Blutbahn nachzuweisen. Die Morphologie der kernlosen roten Blutzellen ist gekennzeichnet durch eine sehr ausgeprägte Anisocytose und Poikilocytose: Neben kugelförmigen Zellen sind auch solche mit einer ange-deuteten Eindellung zu beobachten. Andere Zellen sind bereits napf- bis glockenförmig. Außerdem lassen sich, allerdings nur in geringem Maße, auch deutlich größere, kugelförmige Zellen mit und ohne Eindellung beobachten. Diese Zellen sind zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar. Die Anisocytose und Poikilocytose bildet sich im Laufe der weiteren Entwicklung langsam zurück und ist am Ende des 4. Trimenons völlig ausgeglichen.

Auf Grund der medizinisch-technischen Schwierigkeiten (siehe Methodik) konnten beim Menschen nur folgende Zeitabschnitte der foetalen Blutbildung untersucht werden: 14.-16., 28., 36. und 40. Schwangerschaftswoche. Die Volumenverteilungskurve foetaler Blutzellen aus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ergibt zwei Zellpopulationen. In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen morphologischen Befunden kann angenommen werden, daß Population I kernlosen Zellen und Population II kernhaltigen Zellen entspricht. Dabei stellt die Zellpopulation I mit einem Anteil von 94 % an der Gesamtpopulation bereits die endgültige Erythrocytenpopulation dar. Die Population II, deren prozentualer Anteil nur 6 % beträgt, ist in der 28. Schwangerschaftswoche nicht mehr in der peripheren Blutbahn nachzuweisen.

Da die mittleren Zellvolumina der kernlosen Population I und

und der kernhaltigen Population II, auf Grund unterschiedlicher Formfaktoren (siehe Methodik und Ergebnisse), nahe beieinander liegen, ist die Möglichkeit angedeutet, daß Zellen der Population II, nach Verlust ihres Kernes, Zellen der Population I entsprechen. Dies bedeutet aber, daß bereits in der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche beim Menschen nur Zellen der endgültigen Erythrocytenpopulation in der peripheren Blutbahn nachzuweisen sind.

Die Volumenverteilungskurven von Blutproben aus der 28., 36. und 40. Schwangerschaftswoche und von jedem späteren Zeitpunkt nach Geburt, ergeben jeweils nur noch eine einzige, normalverteilte Zellpopulation.

Aus der embryonalen und foetalen Blutbildungsphase des Menschen konnten nur wenige Zeitabschnitte untersucht werden. Es ist deshalb nicht möglich, eine ähnlich lückenlose Kinetik der Erythropoese wie bei der Ratte und der Maus zu demonstrieren. Dennoch soll versucht werden, die Möglichkeiten der genetischen Regulationsmechanismen darzustellen.

Theorie I: In der 28. und 36. Schwangerschaftswoche, bei Geburt und zu jedem anderen Zeitpunkt nach der Geburt ist in der peripheren Blutbahn jeweils nur eine einzige, normalverteilte Zellpopulation nachzuweisen. Zum Zeitpunkt der Geburt hat das Knochenmark die Bildung der roten Blutzellen bereits vollständig übernommen, es läßt sich nur eine Zellpopulation in der Peripherie nachweisen. In der 36. Schwangerschaftswoche sind Knochenmark und Leber, in der 28. Schwangerschaftswoche Knochenmark, Leber und auch die Milz an der Bildung roter Zellen beteiligt. Da sowohl in der 28. als auch in

der 36. Schwangerschaftswoche aber nur eine normalverteilte Zellpopulation in der peripheren Blutbahn nachzuweisen ist, bedeutet dies, daß alle drei Organe zu diesen Zeitpunkten Zellen der endgültigen Erythrocytenpopulation in die Blutbahn ausschwemmen.

Die Volumenverteilungskurve der Blutprobe aus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ergibt zwar zwei Zellpopulationen, es ist jedoch wahrscheinlich, daß sie kernhaltigen und kernlosen Zellen derselben Zellgeneration, d.h. der endgültigen Erythrocytenpopulation entsprechen. Dies bestätigt einerseits, daß sich in der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche keine Zellen der embryonalen Blutbildungsperiode mehr in der Blutbahn nachweisen lassen und andererseits, daß Leber und Milz, die zu diesem Zeitpunkt an der Erythropoese beteiligt sind, bereits nur Zellen der endgültigen Erythrocytenpopulation in die Peripherie ausschwemmen (siehe oben).

Theorie II: Die erste Codefolge legt wiederum die zeitliche Reihenfolge fest, in der sich die blutbildenden Organe an der Erythropoese beteiligen: 1. Embryonales Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel (2.-12. Schwangerschaftswoche), 2. Leber (8.-40. Schwangerschaftswoche), 3. Milz (12. bis 28. Schwangerschaftswoche) und 4. Knochenmark (ab 20. Schwangerschaftswoche). Die zweite Codefolge bewirkt die Bildung der einzelnen Zellpopulationen.

Die Volumenverteilungskurve der Blutprobe aus der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ergibt die Zellpopulationen I und II. Dabei stellt die kernlose Zellpopulation I mit einem Anteil von 94 % an der Gesamtpopulation bereits die endgültige Ery-

throcytenpopulation dar. Erfolgt die entsprechende genetische Information zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Schwangerschaft, bewirkt sie, daß in zeitlich festgelegter Reihenfolge (1. Codefolge) zunächst das embryonale Mesenchym, dann die Leber, die Milz und das Knochenmark die endgültige Erythrocytenpopulation zu produzieren beginnen. Die Möglichkeit, daß sich auch das embryonale Mesenchym an der Bildung der Endpopulation beteiligen kann, steht im Gegensatz zur bisherigen Vorstellung.

Da die kernhaltigen Zellen der Population II nach Verlust ihres Kernes wahrscheinlich den Zellen der Population I entsprechen, liegt beiden Zellpopulationen derselbe genetische Code zu Grunde.

In der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche ist eine Zellpopulation aus der embryonalen Blutbildungsperiode nicht mehr in der Blutbahn nachzuweisen. Es ist aber anzunehmen, daß ihr ebenfalls eine eigene genetische Information entspricht. Dies bedeutet für den Regulationsmechanismus der Erythropoese, daß die zweite Codefolge beim Menschen nur aus zwei genetischen Informationen besteht.

Vergleich und Wertung der beiden Theorien

Die neuen zytometrischen Ergebnisse zeigen, daß sich während der Entwicklung des erythropoetischen Systems in zeitlich festgelegter Reihenfolge verschiedene Zellpopulationen im peripheren Blut nachweisen lassen. In Verbindung mit den morphologischen Befunden der verschiedenen Organe, die sich ebenfalls in zeitlich festgelegter Reihenfolge an der Blutzellbildung beteiligen, sind zwei Deutungen für den genetischen Regulationsmechanismus der Erythropoese der Säuger denkbar.

Am Beispiel der erythropoetischen Systeme der Ratte, der Maus und des Menschen werden diese beiden Theorien diskutiert. Die Theorie I bietet den Vorteil, daß ein direkter Vergleich möglich ist zwischen den derzeit bekannten morphologischen Befunden über Anfang und Ende der Erythropoese in den verschiedenen Organen einerseits und der Kinetik der verschiedenen Erythrocytenpopulationen in der peripheren Blutbahn andererseits. Eine organspezifische Zuordnung, d.h. die Zuordnung einzelner Erythrocytenpopulationen zu bestimmten blutzellbildenden Organen ist aber an folgende Voraussetzungen gebunden: 1. Eine organspezifische Zellpopulation darf in der peripheren Blutbahn nur dann nachgewiesen werden, wenn das entsprechende Organ schon zu einem früheren Zeitpunkt mit der Blutzellbildung begonnen hat. Dabei ist die Zeitdauer zwischen Neubildung und Ausschwemmung nicht nur durch die Reifungszeit der Zellen festgelegt. Es ist außerdem denkbar, daß das blutbildende Organ diese erstmals neugebildeten Zellen zunächst speichert, bevor es die ersten kernlosen Zellen an die Peripherie abgibt. Der Zeitpunkt, an dem diese Zellpopulation in der Blutbahn erscheint, wird dadurch weiter verzögert. 2. Nach Beendigung der Zellproduktion reifen die zuletzt gebildeten Zellen in dem Organ noch aus und werden zu einem späteren Zeitpunkt in die periphere Blutbahn ausgeschwemmt (siehe 1.). Das Ende der Erythropoese in einem Organ entspricht also nicht dem Ende der Ausschwemmung dieser Zellpopulation. Außerdem haben die kernlosen Zellen in der Blutbahn eine bestimmte Überlebenszeit. Es wäre denkbar, daß diese Überlebenszeit für Zellen aus verschiedenen Blutbildungsorganen unterschiedlich lang ist.

Letztlich wird aber dadurch der Zeitpunkt festgelegt, an dem eine Zellpopulation wieder aus der Blutbahn verschwindet.

Bis auf drei Ausnahmen scheint eine Zuordnung einzelner Erythrocytenpopulationen zu bestimmten blutzellbildenden Organen unter diesen Voraussetzungen möglich. Diese Ausnahmen sind:

1. Bei Ratte und Maus werden die ersten, in der peripheren Blutbahn auftretenden kernlosen Erythrocytenpopulationen dem embryonalen Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel zugeordnet. Nach bisheriger Meinung gelangen aus dieser Blutbildungsphase aber nur kernhaltige Zellen in die Blutbahn. Dies bedeutet gleichzeitig, daß das Verschwinden der kernhaltigen Zellen aus der Peripherie bisher als Ende der embryonalen Blutbildungsperiode bezeichnet wurde. Dies steht ebenfalls im Widerspruch zu den nach Theorie I gedeuteten zyto-metrischen Befunden.
2. Bei der Ratte wird die Population V als endgültige Erythrocytenpopulation dem Knochenmark zugeordnet. Die bisherigen morphologischen Befunde des Knochenmarks weisen aber darauf hin, daß die Erythropoese zwischen dem 8. und 10. Tag nach der Geburt zwar ein Maximum erreicht, sich die Zellen aber nur sehr langsam zu kernlosen Erythrocyten differenzieren, so daß die am 24. Tag in der Blutbahn auftretende Zellpopulation V nicht dem Knochenmark zugeordnet werden kann.
3. Bei der Maus beteiligt sich die Leber nur vom 12. bis 16. Schwangerschaftstag an der Bildung roter Blutzellen. Die Zellpopulation I, die der Leber zugeordnet wird, erscheint aber schon einen Tag nach Beginn der Erythropoese in der Leber und ist nach Beendigung der Zellproduktion am 16. Schwangerschaftstag noch bis zum 32. Tag nach Geburt

in der peripheren Blutbahn nachweisbar. Die kurze Reifungszeit einerseits und die lange Überlebenszeit dieser Zellen andererseits machen eine organspezifische Zuordnung weniger wahrscheinlich. Ein endgültiger Beweis steht aber noch aus. Unter dieser Voraussetzung sollen auch die übrigen Befunde und ihre Bedeutung in der stammesgeschichtlichen Entwicklung des erythropoetischen Systems besprochen werden. Man kann dabei von der Tatsache ausgehen, daß die Ratte im Vergleich zur Maus, und diese wiederum im Vergleich zum Menschen, eine junge Spezies darstellt. Bei der Ratte bildet das embryonale Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel noch zwei kernlose Zellpopulationen; Leber, Milz und Knochenmark jeweils eine kernlose Zellpopulation. Bei der Maus bildet das embryonale Mesenchym und die Leber jeweils eine Zellpopulation, während die Milz und das Knochenmark bereits Zellen bilden, die einer einheitlichen Zellpopulation entsprechen. Das embryonale Mesenchym des Menschen bildet sicherlich auch eine spezifische Zellpopulation, was zwar auf Grund der technischen Schwierigkeiten nicht bewiesen werden konnte, aber auf Grund der morphologischen Befunde sehr wahrscheinlich ist. Wesentlich dabei ist vielmehr, daß bereits in der 14. bis 16. Schwangerschaftswoche Leber und Milz und ab der 20. Schwangerschaftswoche auch das Knochenmark nur Zellen der endgültigen Erythrocytenpopulation bilden. Dies bedeutet insgesamt, daß die verschiedenen blutzellbildenden Organe im Laufe der stammesgeschichtlichen Reifung der Spezies entweder die Fähigkeit verlieren, organspezifische Zellpopulationen zu bilden, oder ein Reifestadium erreichen, indem alle Organe Zellen einer

einheitlichen Population produzieren können.

Die Theorie II nimmt für die genetische Regulation der Erythropoese zwei zeitabhängige Codefolgen an. Dabei ist die erste Codefolge, die die zeitliche Reihenfolge, in der sich die blutbildenden Organe an der Erythropoese beteiligen, durch die morphologischen Befunde bereits bewiesen, während die zweite ebenfalls zeitabhängige Codefolge, die die Bildung der einzelnen Erythrocytenpopulationen bewirkt, bis zum heutigen Zeitpunkt nur eine Vermutung ist. Sie stößt auf keine Widersprüche, da Anfang und Ende dieser genetischen Informationen unbekannt sind. Für diese Theorie spricht der Erythropoese Mechanismus beim Menschen. Hier scheint bewiesen, daß eine genetische Information, in der durch die erste Codefolge zeitlich festgesetzten Reihenfolge, nacheinander die Bildung der endgültigen Erythrocytenpopulation in den verschiedenen Organen bewirkt. Die Theorie II schließt ferner die Möglichkeit ein, daß sämtliche genetischen Informationen der zweiten Codefolge zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Schwangerschaft kurz nacheinander oder vielleicht sogar gleichzeitig erfolgen können, vorausgesetzt, daß dann die zeitliche Reihenfolge, in der die einzelnen Erythrocytenpopulationen in der Blutbahn erscheinen, durch eine unterschiedliche Reifungszeit der Populationen in den verschiedenen Organen festgelegt ist. Dies bedeutet aber, daß z. B. das embryonale Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel entsprechend der bereits erfolgten genetischen Informationen auch verschiedene Zellpopulationen bilden kann und andererseits, daß die Leber als nächstfolgendes Organ der Blutbildung noch Zellen der embryonalen Phase

bilden kann. Beide Folgerungen stehen aber im Gegensatz zur bisherigen Meinung.

Hinsichtlich der stammesgeschichtlichen Reifung der verschiedenen Spezies stellt sich die Frage, welche Bedeutung dabei der Theorie II zukommt, da die Erythropoesemechanismen bei Ratte, Maus und Mensch verschieden sind, ihnen dementsprechend auch verschiedene Codefolgen zu Grunde liegen müssen:

1. Die erste Codefolge bleibt bei Ratte, Maus und Mensch gleich. Dies bestätigen die morphologischen Befunde der verschiedenen blutzellbildenden Organe. 2. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, sind bei der Ratte noch fünf, bei der Maus drei und beim Menschen (in der 14.-16. Schwangerschaftswoche) nur eine kernlose Erythrocytenpopulation in der peripheren Blutbahn nachzuweisen. Ausgehend von der Tatsache, daß die Ratte im Vergleich zu Maus und Mensch die jüngste Spezies darstellt, bedeutet dies, daß im Laufe der stammesgeschichtlichen Entwicklung, die Anzahl der genetischen Informationen der zweiten Codefolge abnehmen. Insgesamt kann also gesagt werden, daß zum derzeitigen Zeitpunkt drei Befunde gegen die Theorie einer organspezifischen Erythropoese sprechen, während am Beispiel des Erythropoesemechanismus vom Menschen die Theorie II bewiesen scheint. Eine eindeutige Wertung beider Theorien ist jedoch auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse sowohl der Morphologie als auch der Zytometrie noch nicht möglich. Letztlich müssen weitere Versuche zeigen, ob es gelingt, die morphologischen Befunde sowohl über Anfang und Ende der Erythropoese in den blutbildenden Organen, als auch über die Speicherung der Zellen im Organ und ihre Über-

lebenszeit in der peripheren Blutbahn, soweit zu ergänzen, daß die Widersprüche zur Theorie I geklärt werden können. Andererseits muß für die Theorie II der Nachweis gelingen, daß an bestimmten Zeitpunkten ein Organ des erythropoetischen Systems auch mehrere Zellpopulationen produzieren kann.

Beiden Theorien gemeinsam sind aber folgende Befunde:

1. Wahrscheinlich auf Grund der stammesgeschichtlichen Entwicklung weisen Ratte, Maus und Mensch verschiedene Erythropoese-mechanismen auf.
2. Die zeitliche Reihenfolge, in der sich die blutzellbildenden Organe an der Erythropoese beteiligen, weist eine charakteristische Tendenz auf: Bei der Ratte beginnen die Leber ab dem 15. Schwangerschaftstag, Milz und Knochenmark ab der Geburt mit der Bildung roter Blutzellen; bei der Maus beginnt die Erythropoese in der Leber bereits am 10. Schwangerschaftstag und in Milz bzw. Knochenmark am 15. bzw. 16. Schwangerschaftstag. Im Verhältnis zur Dauer der Schwangerschaft entspricht die 14. bis 16. Schwangerschaftswoche beim Menschen etwa dem 9. Schwangerschaftstag bei Ratte und Maus. Zu diesem Zeitpunkt sind beim Menschen bereits keine Zellen der embryonalen Blutbildungsperiode mehr in der Blutbahn nachzuweisen. Leber und Milz bilden bereits schon die endgültige Erythrocytenpopulation. Man kann also daraus schließen, daß mit zunehmender Reifung der Spezies, die Entwicklung der blutzellbildenden Gewebe immer weiter in die Foetalzeit zurückverlegt wird.
3. Im Gegensatz zur bisherigen Meinung weisen beide Theorien darauf hin, daß bei Ratte und Maus das Verschwinden der kern-

haltigen Zellen aus der peripheren Blutbahn nicht gleichzusetzen ist mit dem Ende der embryonalen Blutbildungsphase. Das embryonale Mesenchym kann auch kernlose Zellen in die Blutbahn ausschwemmen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Kinetik verschiedener Zellpopulationen, die während der Entwicklung des normalen erythropoetischen Systems in verschiedenen Organen gebildet und zu verschiedenen Zeitpunkten in die periphere Blutbahn ausgeschwemmt werden. Neben den genetisch bedingten Fehlsteuerungen der Erythropoese, wie sie z. B. bei den verschiedenen WW-Genotypen der Maus bekannt sind, sind auch viele Krankheiten und Reaktionen auf körperschädigende Noxen durch eine Anaemie gekennzeichnet oder gehen mit einer solchen einher (2,4,10,11,32,46,49,62,79). In vielen Fällen bewirkt eine Anaemie eine neue Aktivierung des erythropoetischen Systems und führt zur Ausschwemmung von Zellen, die sich von normalen Erythrocyten deutlich unterscheiden. Auf Grund der bislang in der quantitativen Morphologie angewandten Meßverfahren, die für eine exakte Zytometrie wenig geeignet sind, wurde das Auftreten von unreifen, kernlosen Zellformen des erythropoetischen Systems in der peripheren Blutbahn, allgemein als Makrocytose oder Retikuloctyose bezeichnet. Viele Befunde in der Literatur weisen aber darauf hin, daß diese Zellen zum Teil recht deutliche Unterschiede gegenüber den normalen Retikuloctyten zeigen und unter Umständen eine eigene Zellpopulation darstellen. Diese Vermutung scheint sich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen, da die Wahrscheinlichkeit nahe liegt, daß ein Organ oder ein genetischer Code aus der

foetalen Blutbildungsperiode vorübergehend wieder die Ausschüttung einer entsprechenden Zellpopulation in die Blutbahn bewirkt. Besonders geeignet für solche Untersuchungen ist das erythropoetische System der Ratte, da dieses während seiner Entwicklung fünf verschiedene kernlose Zellpopulationen in die Blutbahn ausschwemmt. Hier konnte bereits gezeigt werden, daß nach Röntgenganzkörperbestrahlung mit 600 r, neben einer vorübergehenden Retikulycytose nach 21 Tagen eine neue Zellpopulation in der Blutbahn erscheint(79). Ihr mittleres Zellvolumen zu diesem Zeitpunkt und die Verweildauer dieser Zellen in der peripheren Blutbahn zeigen Parallelen zu der am 20. Tag nach Geburt auftretenden Zellpopulation IV. Vorausgesetzt, daß die Retikulycytose dann als Reaktion des Knochenmarks zu deuten ist, kann dies als Hinweis für die Richtigkeit der oben erwähnten Vermutung gelten.

Für die quantitative Morphologie bedeutet das elektronische Partikelstrahlverfahren eine Erweiterung ihrer Aussagemöglichkeiten, da die Volumina nativer Zellen und deren Änderung direkt mit großer Genauigkeit gemessen werden können. Ganz allgemein könnte das Verfahren in der Morphologie zu einer neuen Einteilung der Reifungsstadien einzelner Zellpopulationen führen. Die vorliegenden Ergebnisse dienen dem besseren Verständnis des komplizierten Systems der roten Blutbildung. Sie bilden einen Anfang bzw. eine neue Grundlage für die Beantwortung der Fragen, die bis zur vollständigen Kenntnis der genetischen Regulationsmechanismen der Erythropoese offen bleiben.

Zusammenfassung

Mit Hilfe des elektronischen Partikelstrahlverfahrens, das auf dem Coulterprinzip beruht, kann das mittlere Zellvolumen nativer Zellen direkt gemessen werden. Das Meßverfahren weist eine wesentlich größere Genauigkeit auf als die bislang in der Zytometrie angewandten histologisch-planimetrischen Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst ein Eichverfahren beschrieben, das die Berechnung korrekter Absolutvolumina ermöglicht. Es werden native Zellen aus der peripheren Blutbahn verschiedener Entwicklungsstufen des erythropoetischen Systems bei Ratte, Maus und Mensch gemessen. Die einzelnen Zellpopulationen werden durch ihr mittleres Zellvolumen, den Variationskoeffizienten, sowie ihren prozentualen Anteil an der Gesamtverteilung charakterisiert.

Die neuen zytometrischen Ergebnisse in Verbindung mit den bereits bekannten morphologischen Befunden der verschiedenen blutzellbildenden Organe, lassen zwei Deutungen für den genetischen Regulationsmechanismus der Erythropoese der Säuger offen:

Theorie I: Die gesamte Erythropoese der Säuger wird nur durch eine zeitabhängige Codefolge geregelt. Sie regt in zeitlich festgelegter Reihenfolge die verschiedenen Organe des erythropoetischen Systems zur Neubildung von Zellen an. Dabei produziert jedes blutzellbildende Organ jeweils eine organspezifische Erythrocytenpopulation.

Theorie II: Die Erythropoese der Säuger wird durch zwei ebenfalls zeitabhängige Codefolgen geregelt: Der erste Code legt

die zeitliche Reihenfolge fest, in der sich die blutzellbildenden Organe an der Erythropoese beteiligen: Embryonales Mesenchym von Dottersack, Chorion und Bauchstiel, Leber, Milz und Knochenmark. Der zweite Code bewirkt in den an der Erythropoese beteiligten Organen, in zeitlich festgelegter Reihenfolge, die Produktion einer neuen, für diesen Code charakteristischen Erythrocytenpopulation. Am Beispiel der erythropoetischen Systeme von Ratte, Maus und Mensch werden diese beiden Theorien diskutiert.

Auf Grund der bisher vorliegenden Befunde und Ergebnisse ist eine eindeutige Antwort auf die Frage nach dem genetischen Regulationsmechanismus der Erythropoese noch nicht möglich. Beiden Theorien gemeinsam sind jedoch folgende Befunde:

1. Wahrscheinlich auf Grund der stammesgeschichtlichen Reifung weisen Ratte, Maus und Mensch verschiedene Erythropoese-mechanismen auf.
2. Mit zunehmender Reifung der Spezies wird die Entwicklung der blutzellbildenden Organe immer weiter in die Foetalzeit zurückverlegt.
3. Im Gegensatz zur bisherigen Meinung weisen beide Theorien darauf hin, daß bei Ratte, Maus und Mensch das Verschwinden der kernhaltigen Zellen aus der peripheren Blutbahn nicht gleichzusetzen ist mit dem Ende der embryonalen Blutbildungsphase. Das embryonale Mesenchym kann auch kernlose Zellen in die Peripherie ausschwemmen.
4. Am Beispiel einer durch Röntgenganzkörperbestrahlung erzeugten Anaemie bei der Ratte scheint die Möglichkeit bestätigt, daß bei einer überstürzten Neubildung von roten

Zellen ein Organ oder ein genetischer Code aus der foetalen Blutbildungsperiode vorübergehend wieder die Ausschwemmung einer entsprechenden Zellpopulation bewirkt.

Literaturverzeichnis

- 1) Ambs, E.: Durchmesser und Hämoglobingehalt der Erythrozyten. Acta haemat. 15, 302-313, 1956.
- 2) Ambs, E.: Die Hämoglobin-Verteilungskurve bei experimentellen Anämien. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Reticulozyten. Acta haemat. 18, 336-345, 1957.
- 3) Ambs, E.: Erythropoese-Probleme. Folia haematologica, Frankf., 7, 76-96, 1963.
- 4) Attfield, M.: Inherited macrocytic anaemias in the house mouse; III. red blood cell diameters. J. Genet. 50, 250-263, 1951.
- 5) Augustin, H.W. und Rapoport, S.: Über den Reifungsprozeß kernhaltiger Erythrozyten: Morphologie, Dimensionen, Wasser- und Hämoglobingehalt. Acta biol. med. germ., 6, 213-221, 1961.
- 6) Barer, R.: Interferenz-mikroskopische Methoden zur quantitativen Zytologie..In "Das Baker Interferenz-Mikroskop", 3. Aufl., 1956.
- 7) Bauer, R.: Zur Schätzung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfanges für stereologische Messungen an histologischen Schnitten. Experientia 25, 554, 1969.
- 8) Bodenstein, H.: Karyometrische Untersuchungen im Schnittpräparat des normalen menschlichen Knochenmarks. Blut, XX, 137-148, 1970.
- 9) Boll, I. und Correll, V.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. Blut, XXIV, 102-114, 1972.
- 10) Borghese, M.: The present state of research on WW mice. Acta anat., 36, 185-220, 1959.
- 11) Brecher, G. und Stohlman, F. jr.: Reticulocyte size and erythropoietic stimulation. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 107, 887-891, 1961.
- 12) Brecher, G., Jakobek, E., Schneidermann, M.A., Williams, G.Z. and Schmidt, P.J.: Size distribution of erythrocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 242, 1962.
- 13) Bucher, N.R.L. and Malt, R.A.: Regeneration of liver and kidney. Little Brown & Comp., Boston 1971.

- 14) Bull, B.S.: On the distribution of red cell volumes. Blood, 31, 503, 1968.
- 15) Cole, R.J. and Paul, J.: The effects of erythropoietin on haem synthesis in mouse yolk sac and cultered foetal liver cells.
- 16) Cole, R.J., Hunter, J. and Paul, J.: Hormonal regulation of pre-natal haemoglobin synthesis by erythropoietin. Brit. J. Haemat., 14, 477-488, 1968.
- 17) Coulter, W.H.: Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. Patent 2656508, 1953.
- 18) Coulter, W.H.: Instruction and service manual for the model F Coulter Counter.
- 19) Craig, M.L. and Russell, E.S.: A developmental change in hemoglobins correlated with an embryonic red cell population in the mouse. Developmental Biology 10, 191-202, 1964.
- 20) Dacie, J.V. and White, J.C.: Erythropoiesis with particular reference to its study by biosy of human bone marrow. A reviev. J. Clin. Path., 2, 1-32, 1949.
- 21) Dilla, M.A., Basman, N.J. and Fulwyler, M.J.: Electronic cell sizing. Los Alamos Scientific Laboratory Report L.A. 3132-MS 182, 1964.
- 22) Fantoni, A., Banks, A., Marks, P.A.: Globin composition and synthesis of hemoglobins in developing fetal mice erythroid cells. Science, 157, 1327, 1967.
- 23) Freerksen, E.: Ein neuer Beweis für das rhythmische Wachstum der Kerne durch vergleichende volumentrische Untersuchungen an den Zellkernen vom Meerschweinchen und Kaninchen. Z. f. Zellforschung u. mikr. Anatomie, 18, 362-399, 1933.
- 24) Gabrieli, E.R. and Wertheimer, M.: Standardisation of the electronic counter of blood cells. Am.J.Clin. Path., 36, 277, 1961.
- 25) Grant, J.L., Britton, M.C., Kurtz, T.E.: Measurement of red blood cell volume with the electronic cell counter. Amer. J. Clin. Path. 33, 138, 1960.

- 26) Gregg, E.C. and Steidley, D.: Electrical counting and sizing of mammalian cells in suspension. *Biophys. J.* 5, 393, 1965.
- 27) Grover, N.B., Naamann, J., Ben-Sasson, S., Doliansky, F.: Electrical sizing of particles in suspension. *Biophys. J.* 9, 1398, 1969.
- 28) Gutmann, J.: Elektronische Verfahren zur Ermittlung statistischer Maßzahlen einiger medizinisch wichtiger Daten. *Elektromedizin*, 11, 62, 1966.
- 29) Hanssler, H. und Riegel, K.: Studien zur Blutmorphologie des Neugeborenen. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, 75, 140, 161, 1954.
- 30) Henning, A.: Fehlerbetrachtungen zur Volumenbestimmung aus der Integration ebener Schnitte. Aus "Quantitative Methoden in der Morphologie". Herausgegeben von Weibel, E.R., und Elias, H. im Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- 31) Hintzsche, E.: Statistische Probleme aus der Kerngrößenforschung. *Experientia* 1, 103-110, 1945.
- 32) Hunter, J.A. und Paul, J.: Haemoglobins of the foetal and adult rat: Sites of synthesis and the effects of erythropoietin. *J. Embryol. exp. Morph.* 21, 361, 1969.
- 33) Hurley, J.: Sizing particles with a Coulter Counter. *Biophys. J.* 10, 74-79, 1970.
- 34) Jacobj, W.: Die Zellkerngröße beim Menschen. Ein Beitrag zur quantitativen Zytologie. *Z. mikr.-anat. Forsch.* 38, 161, 1935.
- 35) Johnson, H.A.: Liver regeneration and the "critical mass" hypothesis. *Am. J. Pathol.* 57, 1, 1969.
- 36) Kachel, V., Metzger, H. und Ruhenstroth-Bauer, G.: Der Einfluß der Partikeldurchtrittsbahn auf die Volumenverteilung nach dem Coulter-Verfahren. *Z. ges. exp. Med.* 153, 331-347, 1970.
- 37) Kachel, V.: Dissertation TU Berlin 1972. Methoden zur Analyse und Korrektur apparativ bedingter Meßfehler beim elektronischen Verfahren zur Teilchengrößenbestimmung nach Coulter.

- 38) Kelly, A. und Davis, R.E.: Automatic erythrocyte volume analysis: Price-Jones curve determination, Laboratory Practice 18, 985, 1967.
- 39) Kleine, N., und Burgass, W.: Die Ursache des elektrischen Widerstandes gepackter Erythrozyten im niederfrequenten Bereich. Acta Haematol. 34, 51-63, 1965.
- 40) Knoll, W.: Die embryonale Blutbildung beim Menschen. Zollikofer St. Gallen, Jahrbuch der st.-gallischen naturf. Gesellschaft 1950.
- 41) Kovach, J.S., Marks, P.A., Russell, E.S. and Epler, H.: Erythroid cell development in fetal mice: Ultrastructural characteristics and hemoglobin synthesis. J. Mol. Biol. 25, 131-142, 1967.
- 42) Kraft, E. und Stickl, H.: Vergleichende Messungen des Wachstums der Rattenleber mittels des Meßquadrantes des Leitzschen Integrationstisches an histologischen Schnitten. Virchows Archiv. path. Anat. 324, 650, 1954.
- 43) Kubitschek, H.E.: Electronic measurement of particle size, Research 13, 128, 1960.
- 44) Künzer, W.: Erythropoese. Monatsschrift für Kinderheilkunde, 102, Heft 2, 89-103, 1953.
- 45) Lajtha, L.G.: Cellular mechanism of red cell production. Series Haematol., Mungsgaard Copenhagen, 2, 26, 1956.
- 46) LeGo, A. et LeGo, R.: XIII. Internationaler Hämatologie-Kongreß, München 1970.
- 47) Leibetseder, F.: Erythropoese und Zellkerngröße. Wien, Z. innere Med., 29, 397, 1948.
- 48) Lewis, S.M. and Burgess, B.J.: A stable standard suspension for red blood counts. Laboratory Practice 15, 305, 1966.
- 49) Lucarelli, G., Howard, D. und Stohlman, F.: Regulation of erythropoiesis. XV. Neonatal erythropoiesis and the effect of nephrectomy. J. of Clin. Investig. 43, 11, 2195-2203, 1964.
- 50) Lucarelli, G., Porcellini, A., Carnevali, C., Carmena, A., Stohlman, F., jr: Fetal and neonatal erythropoiesis. Ann. New York, acad. of Sciences 149, 1,

544-559, 1968.

- 51) Lushbaugh, C.C., Eaman, N.J. and Glascock, B.:
Electronic measurement of cellular volumes.
II. Frequency distribution of erythrocyte volumes.
Blood, 20, 241, 1962.
- 52) Mattern, C.F., Bracket, F.S. and Byron, H.:
Determination of number and size of particle by
electrical gating: Blood cells. J. Appl. Physiol.
10, 56, 1957.
- 53) Metzger, H., Kachel, V. und Ruhenstroth-Bauer:
Einfluß von Partikelgröße, -form und -konsistenz
auf rechtsschiefe Coulter-Volumenverteilungskurven.
Blut XXIII, 143-154, 1971.
- 54) Metzger, H., Valet, G., Kachel, V., Ruhenstroth-Bauer, G.:
The calibration by electronic means of Coulter
Counter for the determination of absolute volumes of
particle. Blut, im Druck.
- 55) Metzger, H., Valet, G., Tongendorff, J., Kachel, V.
und Ruhenstroth-Bauer, G.: Die elektrische Bestimmung des
mittleren Volumens und der Volumenverteilung von nati-
ven Leberzellen und Leberzellkernen. In Vorbereitung.
- 56) Pfeiffer, G.: Elektronische Blutkörperchenzählung und
Größenbestimmung. Z. med. Labortechnik 3, 57, 1962.
- 57) Preis, Ch., Schaudé, G. und Siess, M.: Histometrische
Analyse der Lebervergrößerung nach chronischer Ein-
wirkung von Barbituraten und Halothan. Naunyn-Schmiede-
bergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 254, 489, 1966.
- 58) Rapoport, S.: Molekularbiologische Probleme der Reifung
von Erythrozyten. Folia Haematologica, 89, Heft 2,
105-121.
- 59) Rapoport, S.: Reifung und Alterungsvorgänge in Erythro-
zyten. Fol. Haematol. 78, Heft 3, 364-381.
- 60) Rapoport, S.: Stoffwechselregeneration der roten Blut-
zelle. Fol. Haematol. 83, Heft 3, 298-312.
- 61) Rapoport, S.: Die biochemischen Grundlagen der Reifung
des Säugetier-Erythrozyten: Die Rolle intrazellulärer
Stoffwechselinhibitoren. Die Naturwissenschaften 43,
112, 1956.

- 62) Russell, E.S., Snow, C.M., Murray, L.M. and Cormier, J.P.: The bone marrow in inherited macrocytic anemia in the house mouse. *Acta haemat.* 10, 247-259, 1953.
- 63) Santen, R.J.: Automated estimation of diploid and tetraploid nuclei with an electronic particle counter. *Exp. cell res.* 40, 413, 1965.
- 64) Scharf, J.H., Höpfner, J., Zieman, Chr.: Bemerkungen zur Auswertung histophotometrischer Meßwerte. *Acta histochemica*, 30, 255, 1968.
- 65) Scheidt, R.A. and Blake, W.J.: Use of a suspension of Latex particles of known concentration for monitoring the Coulter Counter.
- 66) Schröder, R.: Zur statistischen Verteilung verschiedener Meßgrößen in der Cyto- und Histometrie.
- 67) Schulte-Hermann, R., Thom, R., Schlicht, I. und Koransky, W.: Zahl und Ploidegrad der Zellkerne der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe; Analysen mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.* 261, 42, 1968.
- 68) Steiner, R.: Kinetik der Zelldifferentiation am Beispiel des erythropoietischen Systems der fötalen Maus. Dissertation TU München und C.N.R.S. Montpellier/Fr. 1971.
- 69) Stohlman, F. jr.: Erythropoiesis *The New England Journal of Medicine*, 267, 7, 342-348, 1962.
- 70) Thom, R.: Coulter Symposium, Bad Nenndorf, 1968.
- 71) Thom, R., Hampe, A. und Sauerbrey, G.: Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen. *Z. ges. exp. Med.* 151, 331, 1969.
- 72) Thom, R. und Kachel, V.: Fortschritte für die elektronische Größenbestimmung von Blutkörperchen. *Blut*, 21, 48, 1970.
- 73) Thom, R.: Vergleichende Untersuchung zur elektronischen Zellvolumen-Analyse. Telefunken Hochfrequenz.
- 74) Tongendorff, J.: Zur Frage der Proliferations- und

- Volumenregulation der Hepatocyten nach experimenteller Teilhepatektomie. Dissertation Universität München 1972.
- 75) Turnbull, E.P.W and Walker, J.: Haemoglobin and red cells. Archives of Disease in Childhood, 30, 102-110, 1955.
 - 76) Undritz, E.: Anomalies héréditaires des cellules du sang. Rev. Hématol. 1950.
 - 77) Ur, A., Lusbaugh, C.C.: Some effects of electrical fields on red blood cells with remarks on electronic real cell sizing. Brit. J. Haematol. 15, 257, 1968.
 - 78) Valet, G., Metzger, H., Kachel, V. und Ruhenstroth-Bauer, G.: Der Nachweis verschiedener Erythrozytenpopulationen bei der Ratte. Blut XXIV, 42-52, 1972.
 - 79) Valet, G., Metzger, H., Kachel, V. und Ruhenstroth-Bauer, G.: Die Volumenverteilungskurven von Rattenerythrozyten nach Röntgenganzkörperbestrahlung. Blut XXIV, 274-282, 1972.
 - 80) Warninghoff, G. und Hausmann, K.: Die Morphologie der embryonalen Hämatopoese des Menschen im Vergleich zu postfetalen Blutbildungsstörungen. Acta haemat., 14, 5, 273-291, 1955.
 - 81) Weed, R.J., Bowdler, A.J.: The influence of hemoglobin concentration on the distribution pattern of the volume of human erythrocytes. Blood, 29, 297, 1967.
 - 82) Weed, R.J. und Reed, C.F.: Amer. J. Med. 41, 681-698, 1966.
 - 83) Wegelius, R.: On the changes in the peripheral blood picture of the newborn infant immediately after birth. Acta Paediatrica, XXXV, Suppl. IV, Helsingfors 1948.
 - 84) Weibel, E.R., Stäubli, W., Gnägi, H.R., Hess, F.A.: Correlated morphometric and biological studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J. of Cell Biol. 42, 68, 1969.
 - 85) Weicker, H.: Die hemi-homoplastische Teilung des

- Proerythroblasten - die Lösung des Stammzellproblems der Erythropoese. *Folia Haematologica*, 74, 49-64, 1957.
- 86) Weicker, H.: Morphologie und Kinetik der normalen und pathologischen Erythropoese. *Folia haematologica*, Neue Folge, 9, 153-196, 1964.
- 87) Winter, H., Sheard, R.P.: The skewness of volume distribution curves of erythrocytes. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 44, 687, 1965.
- 88) Wintrobe, M.M.: Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32-49, 1933.
- 89) Wintrobe, M.M., and Shumacker, H.B., jr.: Erythrocyte studies in the mammalian fetus and newborn. *The American Journal of Anatomy*, 58, No. 2, 313-328, 1936.
- 90) Wintrobe, M.M. and Shumacker, jr.: Comparison of hematopoieses in the fetus and during recovery from pernicious anemia. Together with a consideration of the relationship of fetal hematopoiesis of macrocytic anemia of pregnancy and anemia in infants. *J. Clin. Investigation*, 14, 837-852, 1935.
- 91) Wintrobe, M.M., Baltimore, M.D.: The size and hemoglobin content of the erythrocyte. Methods of determination and clinical application. *J. Lab. and Clin. Med.*, 17, 899-912, 1932.
- 92) Wolfers, H.: Erythroblastenkerngröße während der Blutregulation und ihre Beziehung zur Erythrozytengröße. *Klinische Wochenschrift* 29, 380-382, 1957.
- 93) Zucker, R.M.: Fetal erythroid cell development: Density gradients and size distributions. *J. Cell. Physiol.* 75, 241-252, 1970.

Lebenslauf

Am 27.12.1940 wurde ich als Sohn des selbstständigen Industriekaufmannes Josef Metzger und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Burger in Villingen/Schw. geboren. Ich bin einziges Kind meiner Eltern, wir wohnen in Villingen, Germanstr. 21.

Im Jahre 1947 wurde ich in die Volksschule Villingen aufgenommen und trat 1951 in das dortige Gymnasium ein, wo ich im Jahre 1960 die Reifeprüfung bestand.

Mein Studium begann ich im SS 1960 an der Universität Freiburg, wo ich auch mein Vorphysikum (WS 1960/61) und mein Physikum (WS 1962/63) mit Erfolg abgelegt habe.

Nach dem Physikum studierte ich zwei Semester an der Universität Innsbruck, kehrte dann wieder nach Freiburg zurück und bestand dort nach dem WS 1965/66 das medizinische Staatsexamen. Während der letzten klinischen Semester arbeitete ich in der Neurochirurgie bei Prof. Umbach an meiner Doktorarbeit über das Thema: Thyreogene Geschwülste in Hirn und Wirbelsäule. Gleichzeitig mit dem Staatsexamen promovierte ich zum Dr. med. Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an der Universitätsklinik Würzburg - Innere Medizin und Gynäkologie -, an der Universität Mainz - Chirurgie und Anaesthesie.

Seit Juli 1969 arbeite ich in München am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung für experimentelle Medizin bei Prof. Ruhenstroth-Bauer.

